

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Naftatööstuse jääkprodukte lagundavate bakterite stressitaluvus**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Angela Peeb

Juhendajad

Ph.D. Maia Kivisaar

M.Sc. Tanel Ilmjärv

TARTU 2017

## Infoleht

Bioremediatsioon on odav ning ökonoomne meetod keskkonda reoainetest puhastada. Vajalike kataboolsete radadega bakteritüved on võimelised potentsiaalselt ohtlikud reoained kahjututeks ühenditeks lagundama. Samas võivad need ühendid bakterirakkudele suuremas kontsentratsioonis toksilised olla ja stressi põhjustada. Bakterite ellujäämine toksilisi saasteaineid sisaldavad keskkonnas sõltub suuresti nende võimest kohaneda erinevate stressitingimustega, millele võiks kaasa aidata ka suurenenud mutatsioonisagedus (mutaatorite teke). Käesoleva töö eesmärgiks oli hinnata projekti *“Wastewater reuse: improving the odds by understanding natural attenuation”* raames India õlitöötluskompleksi Uran FTP heitvee puhastusjaamast isoleeritud bakteritüvede stressitaluvust ning uurida, kas sealne stressirohke keskkond on soodustanud mutaatorite teket.

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Märksõnad: stressitaluvus, evolutsioneerumine, ksenobiootikumid, mutatsiooniprotsessid

Bioremediation is a cheap and economical method for cleaning up pollutants from environment. The bacterial strains, which have necessary catabolic pathways, are able to decompose potentially hazardous pollutants into harmless compounds. However, higher concentration of compounds may be toxic for bacteria and cause them stress. In polluted environment survival of bacteria depends of their ability to adapt to different stressors. Increased mutation frequency may help it along. The aim of this study was to evaluate stress tolerance of bacteria who were isolated from India crude oil refinery complex Uran FTP wastewater bioreactor for project *“Wastewater reuse: improving the odds by understanding natural attenuation”* and to investigate whether stressful environment could have stimulates appearance of mutators among bacteria isolated from wastewater treating plant.

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Key words: stress tolerance, evolution, xenobiotics, mutation processes

# Sisukord

|  |    |
|--|----|
| Kasutatud lühendid .....   | 5  |
| Sissejuhatus.....  | 6  |
| 1. Kirjanduse ülevaade.....  | 7  |
| 1.1    Bioremediatsioon .....  | 7  |
| 1.1.1    Bioremediatsiooni tehnoloogiad .....                                    | 8  |
| 1.2    Stressitaluvus .....  | 9  |
| 1.2.1    Üldine stressivastus.....   | 10 |
| 1.2.2    SOS-vastus.....   | 10 |
| 1.2.3    “Poomisvastus” .....  | 10 |
| 1.3    Oksüdatiivne stress .....   | 11 |
| 1.4    Toksiliste saasteainete põhjustatud stress .....                          | 12 |
| 2. Eksperimentaalosa .....   | 14 |
| 2.1 Töö eesmärgid.....   | 14 |
| 2.2 Materjal ja metoodika .....  | 15 |
| 2.2.1 Kasutatud söötmed.....   | 15 |
| 2.2.2 Kasutatud bakteritüved .....   | 15 |
| 2.2.3 Fenooli minimaalse kasvu inhiveeriva kontsentratsiooni määramine .....     | 17 |
| 2.2.4 Bakterite pH taluvuse määramine.....                                       | 17 |
| 2.2.5 Biofilmi moodustamise mõõtmine.....  | 17 |
| 2.2.6 Antibiootikumide resistentsuse testimine .....                             | 18 |
| 2.2.7 Bakterite DNA-kahjustustega toimetuleku testimine UV-kiirguse näitel ..... | 18 |
| 2.2.8 Rif resistentsete mutantide tekkesageduse määramine .....                  | 18 |
| 2.3 Tulemused ja arutelu.....  | 19 |
| 2.3.1 Fenooli minimaalse kasvu inhibeeriva kontsentratsiooni määramine .....     | 20 |
| 2.3.2 pH taluvuse määramine.....   | 23 |
| 2.3.3 Biofilmi moodustamise võime biopuhastist isoleeritud bakteritüvedel.....   | 25 |
| 2.3.4 Antibiootikumide resistentsuse testimine isoleeritud tüvedel.....          | 27 |
| 2.3.5 Biopuhastist isoleeritud bakteritüvede toimetulek DNA-kahjustustega .....  | 29 |
| 2.3.6 Mutaatorite olemasolu biopuhastist isoleeritud bakteritüvede hulgas .....  | 31 |
| Kokkuvõte.....   | 34 |
| Resume.....  | 36 |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| Tänuõnad .....            | 38 |
| Kasutatud kirjandus ..... | 39 |
| LISAD .....               | 46 |

## Kasutatud lühendid

Amp – ampitsilliin

Bp – bensüülpenitsilliin

CAA – *casamino acids*

Glc – glükoos

Gm - gentamütsiin

Km – kanamütsiin

LB – lüsogeenne sööde

mcr – m-kresool

MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (ingl. k. *minimal inhibitory concentration*)

MMR – DNA valepaardumise reparatsioon (ingl. k. *mismatch repair*)

ocr – o-kresool

OD – optiline tihedus

pcr – p-kresool

Phe – fenool

ppGpp – guanosiintetrafosfaat

R2a – Reasoner's 2A

Rif – rifampitsiin

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid

Sal – salitsülaad

Sm - streptomütsiin

SOD – superoksiidi dismutaas

Tet – tetraksüliin

Tol – tolueen

UV – ultraviolet

## Sissejuhatus

Inimtegevuse tagajärjel on keskkonda sattunud selliseid jääkaineid, mida looduslike protsesside käigus ei teki. Need võivad olla nafta-, värvi-, kosmeetika- ja teiste sarnaste tööstuste poolt tekitatud aromaatsete tuumadega ühendid või kemikaalid, mida kokkuvõtlikult nimetatakse ksenobiootikumideks. Reoainete lagundamiseks on välja töötatud erinevad tehnoloogiaid. Üheks kõige odavamaks ning keskkonda säästavamaks peetakse bioremediatsiooni, kus neid ühendeid lagundavad bakterid.

Ksenobiootikumide keemiline struktuur on elusorganismidele sageli võõras, mis tähendab, et nende lagundamiseks peavad bakteritel tekkima uued kataboolsed rajad. Unustada ei saa ka seda, et keskkonda saastavad ühendid on bakteritele sageli toksilised. Võõrapäraste ning potentsiaalselt toksiliste ühendite sattumine bakterite elukeskkonda võib rakke kahjustada ning põhjustada näiteks oksüdatiivset stressi. Sellega võib kaasneda mutatsioonisageduse suurenemine. Enamik mutatsioonidest on neutraalsed, kahjulikud mutatsioonid aga sageli letaalsed. Mutatsioonisageduse suurenemisel (mutaatorfenotüüp) on aga suurem tõenäosus kasulike mutatsioonide tekkeks, mis võimaldavad bakteritel stressirohkes keskkonnas kohasust suurendada. Suure selektiivse surve all jäävad ellu need, kes omavad kasulikke mutatsioone.

TÜMRI geneetika õppetoolis on rahvusvaheline koostööprojekt ERA-NET INNO INDIGO “*Wastewater reuse: improving the odds by understanding natural attenuation*” (WRANA) raames Signe Viggori ja Merike Jõesaare poolt isoleeritud 40 bakteritüve, mis pärinevad Indias Mumbai lähedal asuvast õlitöötluskompleksi (Uran FTP) heitvee puhastusjaamast ja on võimelised lagundama erinevaid fenoolseid ühendeid ja/või alkaane. Detailsemaks uuringuks on valitud välja peamiselt perekondadesse *Pseudomonas* ja *Acinetobacter* kuuluvad 17 tüve eesmärgiga selgitada neist välja kõige sobivamad heitvete puhastamiseks bioaugmentatsiooni teel. Käesolevas töös on isoleeritud bakteritüvesid iseloomustatud, hinnatud nende stressitaluvust ning uuritud, kas keskkond, millest tüved pärinevad, on soodustanud mutaatorite teket.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Bioremediatsioon

Bioremediatsiooniks nimetatakse mikroorganismide abil kahjulike ühendite degradeerimist kahjututeks aineteks (Piper ja Reineke, 2000). Bioremediatsioon on võrreldes teiste tehnoloogiatega odavam, eriti juhul, kui tahetakse lagundada petrokeemilisi ühendeid (Picado, jt., 2006). Suuremat huvi pakuvad lenduvate (VOC; ingl. k. *volatile organic compound*) ning pool-lenduvate (SVOC; ingl. k. *semi-volatile organic compound*) orgaaniliste ühendite lagundamine, kuna osal neist ühenditest on kahjulikud mõjud (Liu jt 2001). Lenduvate ning pool-lenduvate orgaaniliste ühendite alla kuuluvad polütsüklilised süsivesinikud (PAHs), fenool, benseen, toluen, bensüülaldehüüdid ja paljud teised orgaanilised molekulid (Watson jt., 2001). Sellised ühendid sattuvad keskkonda erinevatest tööstustest nagu nafta-, värvi-, kosmeetikatööstused (Nikolaou, jt., 2002), aga ka looduslikest protsessidest nagu metsatulekahjud või taimede elutegevus (Chen jt., 2013). Reostuse korral antud asukohale tüüpiline mikroobide kooslus väheneb, kuid suure degradeerimis võimega bakterite hulk suureneb (Picado jt., 2006). Selgitamaks bakterite võimet lagundada erinevaid saastaineid, tuleb uurida bakterite kataboolseid radu ja geene ning nende geenide lavikut. Uurides degradeerivaid mikroobe nii kultiveerimispõhiste kui ka molekulaarsete meetoditega, on võimalik saada parem ülevaade bioremediatsioonist ning muuta seda efektiivsemaks (Watanabe, Hamamura, 2003). Bioremediatsiooni efektiivsust mõjutavad peale mikroorganismide hulga ning liikide ka keskkonnatingimused, näiteks pH, ionide kontsentratsioon, toitainete hulk, temperatuur, hapniku tase (Holder-Franklin, 1992). On näidatud, et nonüülfenooli lagundamine temperatuuril 7 °C toimus 68%-lise efektiivusega, temperatuuril 25 °C aga 96%-lise efektiivsusega (Manzano jt., 1999). Samuti suurendab bioremediatsiooni määra mineraalsete toitainete, nagu väävel, sulfaat ja lämmastik olemasolu (Žgajnar, Zagorc-Končan, 1999).

Selgitamaks bakterite võimet degradeerida keskkonda saastavaid ühendeid, identifitseeritakse bakterites töötavad kataboolsed rajad ja uuritakse neis osalevate ensüümide spetsiifikat katabolismiraja substraatidele ja vaheühenditele (Seo, jt., 2009). Aromaatsete tuumadega ühendite lagundamise võib jagada kaheks: aeroobseks ja anaeroobseks. Mõlema metabolismitüübi puhul toimub metabolismiraja esimeses osas polütsükliliste aromaatsete ühendite lagundamine monotsüklilisteks. Seda osa aeroobses keskkonnas läbiviivad ensüümid

on tavaliselt kodeeritud plasmiidsete geenidega ja on kasvusubstraadi suhtes väiksema spetsiifilisusega. Seejärel lagundatakse aromaatne tuum ehk toimub dearomatiseerimine. Mõlema etapi reaktsioonides osalevad mitmed mono- ja dioksügenaasid. Aeroobse metabolismi puhul toimub aromaatsete ühendite oksüdatsioon. Anaeroobsetes tingimustes toimuvad mõlemas etapis redutseerimisprotsessid (karboksülatsioon, dehüdroksülatsioon jpt.) (Dutton ja Evans, 1969).

### 1.1.1 Bioremediatsiooni tehnoloogiad

Esimene bioloogiline reoveepuhasti loodi 1891. aastal Sussexi linna Ühendkuningriikides, kuid tõendeid komposteerimisest on leitud juba 6000 aastat e.Kr. Termin “bioremediatsioon” võeti esmakordselt kasutusele alles 1987. aastal (Leung, 2004).

Bioremediatsiooni on võimalik läbi viia nii kohapeal (*in situ*) kui ka mujal (*ex situ*). *In situ* meetodite hulka kuuluvad biostimulatsioon ning bioaugmentatsioon (Gomes jt., 2013). Biostimulatsiooni meetod põhineb looduslike mikroorganismide lagundamisaktiivsuse stimuleerimises. Mikroobide lagundamisefektiivsust toetatakse toitainesooladega rikastatud vee ning hapniku pumpamisega reostunud alale (Seklemova jt., 2001). Bioaugmentatsiooni meetod seisneb selektiivses söötmes ettekasvatatud spetsiifiliste metaboolsete omadustega mikroobide viimises reostunud pinnasesse või vette. Antud kontekstis tähendab söötmete selektiivsus reostunud keskkonna keemilise koostise võimalikult täpset kopeerimist (Vogel, 1996; Tyagi jt., 2011). *In situ* bioremediatsiooni puhul on oluline teada tegureid, mis reoainete lagundamist mõjutavad. Kui protsesse piisavalt kaua ei jälgita ning nende ohutuses ei veenduta, võib juhtuda, et biolagundamisel tekkivad ühendid on algsetest reoainetest toksilisemad (Nõlvak jt., 2007). *Ex situ* üks võimalustest on aunkomposteerimine. Reostunud pinnas kaevatakse välja ning segatakse tugiainega (saepuru, hakkpuit, saepuru vms.), toitesoola- ja mikroobiallikaga. Tugiaine ning aunade aeg-ajalt segamine loovad aeroobse keskkonna, kus mikroobid kiirelt paljunevad. Temperatuuri tõus aunas näitab bioloogiliste protsesside toimumise aktiivsust (Jørgensen jt., 2000). Teine võimalus pinnase parandamiseks on kasutada bioreaktoreid. Need on kinnised mahutid, kuhu reostunud pinnas või vesi kogutakse. Bioreaktoris on reoaineid lagundavad mikroobid, kelle lagundamisefektiivsuse maksimumi saavutamiseks on võimalik lagundamiskeskkonna näitajaid (pH, temperatuur, hapniku- ja toitainetesisaldus) reguleerida (Gargouri jt., 2011; Cassidy, 2000).



## 1.2 Stressitaluvus

Bakterite eksponentsiaalne kasv on üldiselt jälgitav vaid laboritingimustes, tavapärase elukeskkonnas on see erandlik juhus. Looduses kasvavad bakterid aeglaselt või üldse mitte (on statsionaarses faasis), sest neil tuleb taluda stressi. Stress on bioloogiliste süsteemide normaalse talitluse häirumine, mis põhjustab rakkude kasvu aeglustumist või surma (Bijlsma ja Loeschke, 2005). Stressi tekitavad näiteks toitainete puudus ja keskkonna füüsikaliste parameetrite muutumine (Hecker, Völker, 2001; Nyström, 2004; Kivisaar, 2010).

Selektiivne surve, mis stressitingimustes bakteritele mõjub, sunnib neid evolutsioneeruma, et antud tingimustes ellu jääda. Kohanemine võib toimuda nii füsioloogilise adapteerumise teel kui ka mutatsioonide tekke tagajärjel. Oluline on mõista, et evolutsioneerumise puhul ei ole alati peamine saada uusi geene või modifitseerida olemasolevaid ensüüme, vaid ka teatud geenide inaktiveerimine ning erinevate funktsioonide kaotamine võib olla kasulik (Hottes jt., 2013).

Elamine stressirohkes keskkonnas soodustab bakteritel genoomsete muutuste tekkimist, mis on seotud mutatsioonisageduse tõusuga (Ryall jt., 2012). Suurem osa mutatsioonidest on neutraalsed või peaaegu neutraalsed. Kahjulikke või kasulikke mutatsioone tekib harvem (Lenski jt., 2013). Mutatsioonid tekkivad, kui stressirohkes keskkonnas on DNA sünteesimine DNA polümeraasi poolt vigaderohke ning reparatsioonisüsteemid ei suuda korraga kõigi vigade parandamisega hakkama saada (Galhardo, 2007; Kivisaar jt., 2010). DNA reparatsioonimehhanismid saab jagada kategooriasse: otsene parandamine (valgussõltuv DNA reparatsioon), nukleotiidi väljalõike reparatsioon, lämmastikaluse väljalõike reparatsioon ning DNA ühe- ja kaheahelaliste katkete reparatsioon (Sancar, jt., 2004). Juhul kui reparatsioonirada on defektne, võib see samuti mutatsioonisagedust tõsta (Ryall jt., 2012). Kahjulikke mutatsioone tekib tihemini kui kasulikke, mistõttu on kõrgel mutatsioonisagedusel negatiivne efekt kohasusele (ingl. k. *fitness*). Katses, kus stressirohkesse keskkonda pandi kasvama kõrge mutatsioonisagedusega ning metsiktüüpi *E.coli* rakud, oli näha, et kõrgema mutatsioonisagedusega tüvi adapteerus kiiremini kui metsiktüvi ning tema rakkude arvukus populatsioonis suurenes (Lenski jt., 1997). Looduses võib esineda ka ajutist mutatsioonisageduse tõusu, mis on vastuseks stressile. Stressivastused on üldine stressivastus, SOS-vastus ning “poomisvastus” (Ryall jt., 2012).

### 1.2.1 Üldine stressivastus

Üldist stressivastust kutsub bakterirakus esile nälgimine ja/või statsionaarsesse kasvufaasi jõudmine (Pandza jt., 2000; Foster, 2007). Sellistes tingimustes tõuseb RNA polümeraasi sigma faktori RpoS tase. RpoS indutseerib transkriptsiooni spetsiifilistest RpoS poolt ära tundvatelt promootoritelt, et transkribeerida geene, mis aitavad bakterirakul ebasoodsates tingimustes ellu jääda (Layton jt., 2003).

### 1.2.2 SOS-vastus

SOS-vastus kutsutakse bakterites esile DNA kahjustuste korral. Kahjustused, mis on põhjustatud keemiliste või füüsikaliste tegurite poolt, näiteks UV-kiirgus, indutseerivad mutatsioonisageduse tõusu SOS-vastuse kaudu (Sutton, 2000). Lisaks replikatiivsetele DNA polümeraasidele, polümeraas III ja polümeraas I (Staudenbauer, 1976), on bakteritel spetsialiseeritud DNA polümeraasid, mis viivad sünteesi läbi, kui replikatiivsed seda ei tee. DNA polümeraas V ja polümeraas IV kuuluvad Y-perekonna DNA polümeraaside hulka. Selle perekonnas polümeraasidel puudub 3' – 5' eksonukleaassus, mistõttu on süntees vigaderohke. Lisaks on Y perekonna polümeraasidel piisavalt suur aktiivsenter, et sinna mahuvad kahjustuste tõttu modifitseerunud nukleotiidid (Ling jt., 2001). Seetõttu suudavad nad läbi viia DNA sünteesi ka kahjustatud DNA-lt (*translesion DNA synthesis, TLS*), mistõttu neid nimetatakse ka TLS polümeraasideks. DNA kahjustuse korral DNA replikatsioon peatub ja tekivad üheaahelised DNA piirkonnad (ssDNA). Rekombinaas RecA tunneb selliseid piirkondi ära ning moodustab ssDNA-ga nukleoproteiinse kompleksi, aktiveerides LexA repressori autoproteolüüsi. LexA lagundamine kutsub esile SOS reguloni geenide transkriptsiooni aktiveerumise, mille tagajärjel suureneb Y-perekonna ja ka teiste TLS polümeraaside ekspressioon (Foster, 2007; Ryall jt., 2012; Kivisaar jt., 2010).

### 1.2.3 “Poomisvastus”

“Poomisvastus” indutseeritakse siis kui bakteri kasvukeskkonnas ei ole piisavalt aminohappeid või toitaineid. Sellist mehhanismi vahendab guonosiintetrafosfaat ppGpp. Koos koefektoriks oleva DskA-ga toimub seostumine RNAP-ga, mis aitab transkriptsiooni reguleerida. ppGpp reguleerib positiivselt või negatiivselt transkriptsiooni initsiatsiooni erinevatelt promootoritelt,

mõjutades sel viisil näiteks aminohapete transportimist rakku ning mitmeid ensüüme kodeerivaid geene. “Poomvastuse” esilekutsumisega on võimalik peatada DNA replikatsioon (Gourse jt., 2007). Pikajajalisel DNA replikatsiooni seiskamisel võib DNA replikatsiooni reinitsieerimine toimuda Y-perekonna DNA polümeraaside abil (Foster, 2007).

### 1.3 Oksüdatiivne stress

Termin “oksüdatsiivne stress” viitab olukorrale, kus kahjulikke reaktiivseid hapnikuühendeid (ROS) tekib rohkem kui organismi kaitsesüsteemid neid neutraliseerida jõuavad. Reaktiivsete hapnikuühendite alla kuuluvad vesinikperoksiid, superoksiid ja hüdroksüülradikaal (Halliwell, 2007). Superoksiid moodustub siis, kui hapniku molekul saab elektroni elektrondonorilt, näiteks flavoproteiinilt. Vesinikperoksiid moodustub, kui hapniku molekul saab lisaks kaks elektroni (Mongkolsuk, 2012; Kuo jt., 1987). Nende mõju väljendub rakkude makromolekulide kahjustamises. Reaktiivsed hapnikuühendid on suunatud peamiselt DNA, RNA, valkude ja lipiidide vastu. Oksüdatiivne stress mõjub kõige suuremal määral lipiididele, kuna vabad radikaalid saavad membraani koostisesse kuuluvate küllastumata rasvhapetega reageerida ning initsieerida sellega lipiidide peroksüdatsiooni. Selle tulemusel muutub membraan viskoossemaks. Membraani voolavuse vähenemine aktiveerib membraanvalke, mis toob kaasa veel suuremal hulgal radikaalide genereerimise (Humphries, Szweda, 1998). Anaeroobsetes tingimustes elavate organismide puhul on oksüdatiivse stressi vältimine võimatu, kuna ROS-id formeeruvad kui molekulaarne hapnik elektronikandjat oksüdeerib (Halliwell, 2007). Kokkupuude aromaatsete ühenditega, nagu näiteks fenool või tolueen võivad samuti bakterirakus oksüdatiivse stressi esile kutsuda (Domínguez-Cuevas jt., 2006; Kivisaar, 2010). Lisaks võib sellist stressi põhjustada kokkupuude antibiootikumidega (Kohanski jt., 2007) ning aromaatsete ühendite lagundamisel aset leidvad oksüdatsiooni reaktsioonid (Lee, 1999). Oksüdatiivse stressi põhjustatud kahjustused DNA ahelas on mutatsioonide allikad, seega võib ROS-ide hulga suurenemine rakus kiirendada bakterite evolutsioneerumist (Kim jt., 2014).

Reaktiivsete hapnikuühendite mõju vähendamiseks ning eemaldamiseks on bakteritel välja kujunenud mitmeid ensüüme. Tüüpilised ensüümid on superoksiidi dismutaas (SOD), katalaas, peroksüdaasid. SOD-id reageerivad superoksiidiga, muutes selle vähem reaktiivseks vesinikperoksiidiks ja hapnikuks. Vesinikperoksiidi töödeldakse edasi katalaaside ja peroksüdaasidega nii, et lõpp-produktideks on vesi ja hapnik. Vastavalt kasutatavale kofaktorile

jagunevad SOD-id: CuZn klastriga SOD, Ni-SOD, Fe-SOD ja Mn-SOD. Suuremal osal pseudomonaadidest esinevad vaid Mn-SOD ja Fe-SOD (Kim jt., 2014).

Vastust oksüdatiivsele stressile reguleerivad bakteris *E. coli* regulaatorid SoxR ja OxyR. Transkriptsioonifaktor OxyR aktiveerib kaitsvate aktioksüdantide, nagu näiteks hüdroksüperoksidaas I, alküülhüdroperoksidaasi reduktaasi jpt. ekspressiooni, et alandada vesinikperoksiidi taset. OxyR on enamasti inaktiivses olekus, kuid vesinikperoksiidi hulga suurenedes oksüdeerub ning muutub aktiveerimisvõimeliseks (Åslund jt., 1999). SoxR on transkriptsiooniline aktivaator, mis reguleerib geene, mida vajatakse oksüdatiivse stressi vastusel (Imlay, 2013).

## **1.4 Toksiliste saasteainete põhjustatud stress**

Aromaatsete tuumadega ühendeid peetakse keskkonda saastavateks, kuna suur osa neist on toksilised ning seetõttu kahjulikud. Ühtlasi on aromaatsed ühendid väga stabiilsed, mis muudab nende lagundamise keeruliseks. Bakterite suur geneetiline paindlikkus võimaldab bakteritel võtta kasutusele uusi süsinikuallikaid, kuhu kuuluvad ka keskkonda saastavad orgaanilised ühendid. Inimtegevuse tõttu keskkonda sattunud ksenobiootikumid ei ole küll looduslikud, kuid bakterite kiire evolutsioneerumine võimaldab ka nende lagundamise bakterite abil (Carmona, 2009).

Orgaaniliste ühendite või lahustitega kokkupuutumine põhjustab raku membraani struktuuris muutusi ja/või kahjustab raku elutegevuseks olulisi biosünteesi radu. Seetõttu on bakteri esimeseks kaitsemehhanismiks suurendada membraani jäikust ning vähendada läbilaskvust. On leitud, et orgaanilise solvendi kahjuliku mõju suurus on korrelatsioonis selle hüdrofoobsusega. Mida kõrgem on solvendi hüdrofoobsus, seda ohutum see rakule on. Lisaks on täheldatud, et orgaaniliste saasteainete heterogeenne segu on rakkudele kahjulikum kui homogeenne segu (Ramos jt., 2002).

Aromaatsete ühendite põhjustatud membraanikahjustused põhjustavad rakule oksüdatiivset stressi, langeb elektrontransportaehla aktiivsus, vesinikperoksiidi kontsentratsioon tõuseb. Lisaks üldisele stressivastusele, põhjustab valkude valesti pakkimine ka kuumašoki vastuse (Santos jt., 2004). Kõrgel fenooli kontsentratsioonil aktiveerub näiteks bakteris *Pseudomonas*

*putida* membraani terviklikkust tunnetav vastuste kompleks, mida reguleerib CoIR/CoIS kahekomponendiline süsteem (Kivistik jt., 2006).

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Töö eesmärgid

Üha suurenev reoainete hulk keskkonnas on pannud inimesi välja töötama uusi tehnoloogiaid nende vähendamiseks, kuna tihti akumulatuurivad kahjulike mõjudega keemilised ühendid vette ja jõuavad nii inimeste organismi. Üheks võimaluseks on kasutada bioremediatsiooni. Selle eelisteks on odavus, ökonoomsus ja keskkonnasõbralikkus (Picado, jt., 2006; Kshirsagar, 2013).

Loodusest on isoleeritud palju bakteritüvesid, kes suudavad lagundada erinevaid reoaineid, nagu näiteks fenoolsed ühendid või alkaanid. Rakkude mitmekülgne metabolism ja kiire evolutsioneerumine annavad võimaluse neid bioremediatsioonis kasutada (Silby jt., 2011). Paljud lagundamist vajavad reoained on inimeste poolt tekitatud ega ole keskkonnale iseloomulikud. See tähendab, et mikroobidel pole vajalikke kataboolseid radu, mille abil reoained kahjututeks ühenditeks muuta. Küll aga on mikroobid kahjulike ainetega kokku puutudes võimelised adapteeruma ning evolutsioneeruma. Perekond *Pseudomonas* esindajad on heaks näiteks sellest, kuidas rakud on võimelised sobilike kasvusubstraatide hulka suurendama (Jiménez jt., 2002). Mikroobide metabolismi potentsiaali ära kasutamine bioremediatsiooniprotsessides on ohutum ning ökonoomsem alternatiiv seni laialt levinud füüsikalise-keemiliste strateegiate asemel (Piper, Reineke, 2000).

Minu bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli iseloomustada koostööprojekti “Reovete taaskasutus: mikroobsete protsesside optimeerimine looduslikes tingimustes” raames isoleeritud bakteritüvesid. Bakteritüved isoleerisid Indias Mumbai lähedal asuvast õlitöötluskompleksi Uran FTP puhastusjaama heitveest Signe Virro ja Merike Jõesaar. Bakalaureusetöö eesmärgiks oli hinnata isoleeritud bakteritüvede stressitaluvust ning välja selgitada, kas keskkond, millest tüved pärinevad soodustab mutaatorite teket.

## **2.2 Materjal ja metoodika**

### **2.2.1 Töös kasutatud söötmed**

Söötmetena kasutati R2A tardsöödet (Reasoner, Geldreich, 1985), LB-tardsöödet (Miller, 1972) või M9 minimaalsöödet (Adams, 1959), millele lisati mikroelementide lahust (Bauchop, Elsdén, 1960) ning süsinikuallikana glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 10 mM. Glükoosi sisaldavasse vedelsöötmesse lisati ka 0,4% kaseiini hüdrolysaati (CAA).

Kasutatud antibiootikumid ja nende lõppkontsentratsioonid söötmes olid järgmised: rifampitsiin (Rif; 100 µg/ml), gentamütsiin (Gm; 60 µg/ml), tetraksülin (Tet; 100 µg/ml), ampitsilliin (Amp; 100 µg/ml), bensüülbenitsiliin (Bp; 3 mg/ml), streptomütsiin (Sm; 40 µg/ml) ja kanamütsiin (Km; 50 µg/ml).

### **2.2.2 Töös kasutatud bakteritüved**

Antud bakalaureusetöös kasutati bakteritüvesid, mille isoleerisid TÜ MRI geneetika õppetooli teadurid Signe Viggor ja Merike Jõesaar Indas Mumbai lähedal asuvast õlitöötluskompleksi (Uran FTP) puhastusjaama heitveest. Tüved on võimelised lagundama erinevaid fenoolseid ühendeid ja/või alkaane (Vt. Tabel 1).

Kõiki töös kasutatud bakteritüvesid on kasvatatud temperatuuril 30 °C. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil 180 pööret/minutis. Töös kasutatud bakteritüved on toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Töös kasutatud bakteritüved<sup>a</sup>

| <b>Tüve nimi</b>                                     | <b>Liik/Perekond</b>                          | <b>Kasvusubstraadid</b>      |
|--|---|------------------------------|
| <b>ICTN 3</b>  | <i>Acinetobakter sp.</i>                      | alk                          |
| <b>ICTN 6a</b>                                       | <i>Acinetobakter</i>                          | alk                          |
| <b>ICTN 10</b>                                       | <i>Acinetobakter</i>                          | alk                          |
| <b>ICTN2</b>   | <i>Acinetobakter</i>                          | phe, alk                     |
| <b>ICP1</b>  | <i>Acinetobakter venetianus</i>               | phe, ocr, mcr, alk           |
| <b>IS10</b>  | <i>Bacillus megaterium/subtilis</i>           | phe, sal, pcr, ocr, mcr, alk |
| <b>ICP24</b>   | <i>Bacillus sp/megaterium</i>                 | phe, sal, pcr, ocr, mcr      |
| <b>ICTN17</b>  | <i>Cellulomonas</i>                           | phe, pcr, ocr, mcr           |
| <b>ICTN1</b>   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 | alk                          |
| <b>ICTN11</b>  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 | alk                          |
| <b>IS5</b>   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 | alk                          |
| <b>ICTN5</b>   | <i>Pseudomonas stutzeri/balearica</i>         | tol                          |
| <b>ICTN4a</b>  | <i>Pseudomonas stutzeri/pseudoalcaligenes</i> | phe, pcr, ocr, mcr, alk      |
| <b>ICTN12</b>  | <i>Pseudomonas stutzeri/pseudoalcaligenes</i> | phe, pcr, ocr, mcr, alk      |
| <b>ICTN13</b>  | <i>Pseudomonas stutzeri/pseudoalcaligenes</i> | phe, pcr, ocr, mcr, alk      |
| <b>ICP3</b>  | <i>Pseudomonas stutzeri/pseudoalcaligenes</i> | phe, pcr, ocr, mcr           |
| <b>ICP18</b>   | <i>Pseudomonas stutzeri/pseudoalcaligenes</i> | phe, pcr, ocr, mcr           |
| <b>PaW85</b>   | <i>P. putida</i>                              |                              |
| Allikas: S. Viggor ja M. Jõesaar (avaldamata andmed) |   |                              |

<sup>a</sup>Töös kasutatud bakteritüved on võimelised lagundama mitmeid keskkonda saastavaid ühendeid: phe – fenool; sal – salitsülaat; pcr – p-kresool; ocr – o-kresool; mcr – m-kresool, tol – toluen; alk - alkaanid



### 2.2.3 Fenooli minimaalse kasvu inhiveeriva kontsentratsiooni määramine

Määramaks fenooli minimaalset kasvu inhiveerivat kontsentratsiooni (MIC; ingl k – *minimal inhibitory concentration*), mille puhul uuritavad tüved polnud enam võimelised kasvama, inkubeeriti bakterikultuure esmalt üleöö temperatuuril 30 °C, aereerides neid loksutil. Mikrotiiterplaadile tehti glükoos+CAA söötmesse fenoolist vajalike kontsentratsioonidega lahjenduste rida. Igasse fenooli lahjendusse kanti üleöö kultuuri 100-kordset lahjendust. Mikrotiiterplaati inkubeeriti 24 tundi temperatuuril 30 °C loksutil ning seejärel mõõdeti bakterikultuuride optiline tihedus lainepikkusel 580 nm mikrotiiterplaadi lugejas *TECAN Sunrise* programmiga *Magellan 6*.

### 2.2.4 Bakterite pH taluvuse määramine

pH taluvuse määramine viidi läbi kolme erineva pH-ga R2A tardsöötmetel (pH=8, pH=9 või pH=10). pH stabiliseerimiseks lisati tardsöötmesse ka vastava pH-ga M9 puhvrit. Uuritavatest kultuuridest tehti söötmetele joonkülvid ja rakke kasvatati üleöö temperatuuril 30 °C termostaadis.

### 2.2.5 Biofilmi moodustamise mõõtmine

Biofilmi moodustumise mõõtmiseks kasutati Fletcheri modifitseeritud protokoll (Fletcher, 1977). Biofilmi mõõtmiseks kasvatati bakteritüvesid üleöö katseklaasides temperatuuril 30 °C loksutil 2,3 ml-s M9 vedelsöötmes, mis sisaldas ka glükoosi ja CAA-d. Biofilmi teket mõõdeti 4, 24, ja 48 tunni möödudes. Üleöö kasvanud kultuuridel mõõdeti optiline tihedus, selleks et ühtlustada kõikide tüvede tihedus värskes Glc+CAA söötmes. Sama optilise tihedusega tüvede kultuurid kanti mikrotiiterplaadile mahus 100 µl.

Biofilmi hulga hindamiseks värviti rakke 25 µl 1%-lise kristallvioleti vesilahusega 15 minuti vältel. Järgmiseks eemaldati vabad rakud ning värvilahus. Tekkinud biofilmi pesti seejärel kaks korda 150 µl destilleeritud veega. Biofilmi jäänud värvilahuse kätte saamiseks pesti mikrotiiterplaadi kaevu põhjalikult 180 µl 95%-lise etanooliga. Saadud lahusest tehti destilleeritud veega kolmekordne lahjendus, mille optilist tihedust mõõdeti lainepikkusel 580 nm mikrotiiterplaadi lugejas *TECAN Sunrise*, kasutades programmi *Magellan 6*. Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks biofilmi moodustumisl erinevate bakteritüvede puhul kasutati

dispersioonianalüüsi (ingl. k. *analysis of variance*; ANOVA) ja Dunnett'i testi olulisuse nivooga  $p < 0,05$  programmis STATISTICA 10.

### **2.2.6 Antibiootikumide resistentsuse testimine**

Antibiootikumide resistentsuse määramiseks kasvatati baktereid üleöö temperatuuril 30 °C katseklaasides 2,3 ml-s Glc+CAA vedelsöötmes ja külvati seejärel tardsöötmele, mis sisaldas erinevaid antibiootikume. Antibiootikumid lisati LB tardsöötmesse järgnevate lõppkonsentratsioonidega: Gm 60 µg/ml, Km 50 µg/ml, Tet (100 µg/ml), Amp 100 µg/ml, Rif 100 µg/ml, Sm 40 µg/ml ning Bp 3 mg/ml. Rakud külvati antibiootikume sisaldavatele LB tardsöötmele joonkülvil meetodil ning inkubeeriti temperatuuril 30 °C 48 tundi.

### **2.2.7 Bakterite DNA kahjustustega toimetuleku testimine UV-kiirguse näitel**

UV-kahjustustega toimetuleku hindamiseks tehti üleöö Glc+CAA söötmesse temperatuuril 30 °C loksutil kasvatatud kultuuridest lahjendused. Lahjendused tehti mikrotiiterplaadile M9 puhvris. Seejärel kanti LB tardsöötmele 10 µl-ste tilkadena rakususpensioone kuuest erinevast lahjendusest:  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ . Bakteritüved kanti paralleelselt kolmele tassile, millest esimene oli rakkude elumuse määramiseks, teist kiiritati UV-C valguses (UV Crosslinker mudel CX-2000; tootja: UVP, USA) doosiga  $10 \text{ J/m}^3$  ja kolmandat tassi doosiga  $20 \text{ J/m}^3$ . Nii kiiritatud kui ka kiiritamata rakke inkubeeriti üleöö temperatuuril 30 °C ja tüvede UV-taluvus määrati kiiritatud ja kiiritamata rakkude suhtena. Katset korraldati kolm korda.

### **2.2.8 Spontaanse mutatsioonisageduse määramine fluktuatsioonitestiga**

Spontaansete mutatsioonide tekkesageduse määramiseks leiti Rif resistentsete (Rif<sup>r</sup>) mutantide tekkesagedus. Selleks kasvatati rakke 6 tundi temperatuuril 30 °C M9 minimalsöötmes, millele oli lisatud CAA ja süninikuallikana glükoos. Seejärel tehti bakterikultuuridest  $10^5$ -kordsed lahjendused ning jagati need 2,3 ml kaupa katseklaasidesse. 20-24 tundi kasvanud sõltumatutest kultuuridest plaaditi 500 µl kultuuri rifampitsiini sisaldavale LB tardsöötmele ja inkubeeriti temperatuuril 30 °C. Seejärel loetleti 48 tunni jooksul tekkinud kolooniad.

Rif<sup>r</sup> kolooniate tekkesageduse määramiseks tuli järgnevalt määrata üleöö kasvanud vedelkultuuridest elusarakkude arvukus. Selleks tehti kultuuridest lahjenduste read M9

puhvrisse ja kanti 10 µl kaupa LB tardsöötmele. Lähtudes lahjendusfaktorist ja LB söötmele tekkinud kolooniate arvust, määrati kolooniaid moodustavate rakkude hulk 1 ml üleöö kasvanud kultuuri kohta. Järgnevalt leiti Rif<sup>r</sup> kolooniate tekkesagedus 1 ml üleöö kasvanud vedelkultuuri kohta.

Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks mutatsioonisagedustes erinevatel bakteritüvedel kasutati Kruskal-Wallise testi olulisuse nivooga  $p < 0,05$  programmis STATISTICA 10.

## **2.3 Tulemused ja arutelu**

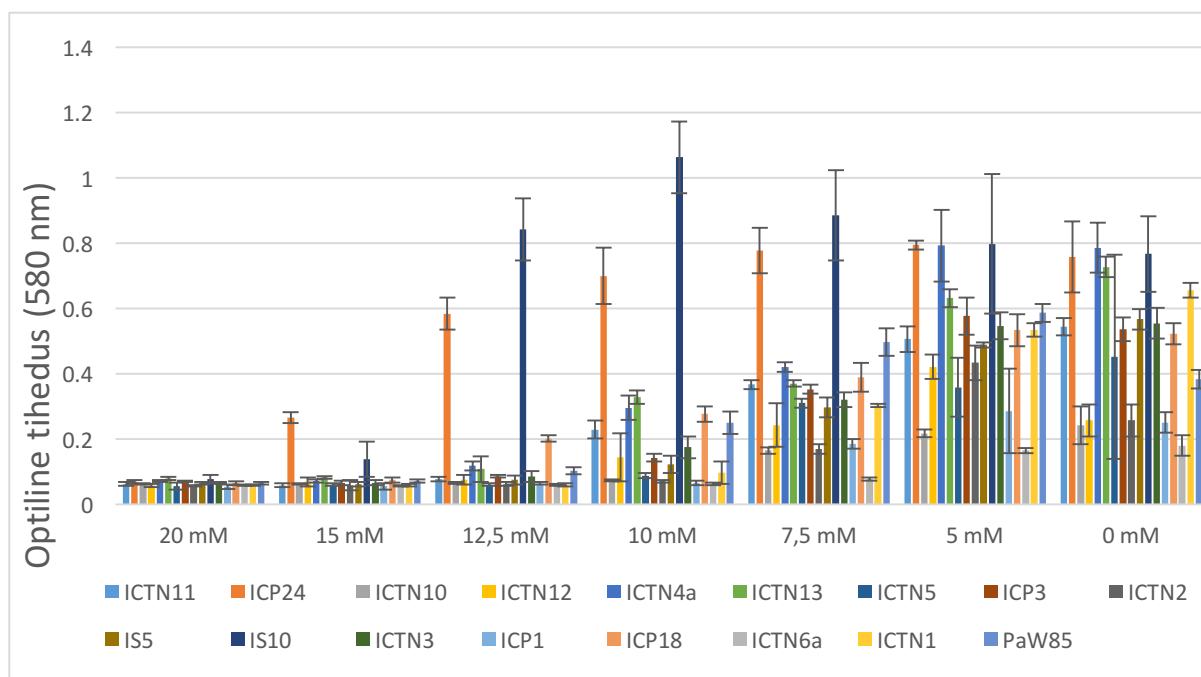
Bakalaureusetöös kasutatud bakteritüved on pärit Indias asuvast Uran FTP õlitöötluskompleksi reovee puhastusjaama biotornist (ingl. k. *biotower*). Biotornid on silindrikujulised mahutid,

mille sees on filteritaidis, kuhu kinnituvad ka reoaineid lagundavad bakterid, moodustades seal biofilmi. Filtertaidis ei pea olema homogeenne, vaid võib sisaldada erinevaid filtreerivaid materjale. Oluline on võimalus torni õhuga aereerida, mistõttu pumbatakse tihti õhku biotorni alumisest osast sisse, et see läbi torni kõrgemale tõuseks ja nii tervet kompleksi aereeriks. Enne puhastatava vee biotorni pumpamist võib seda veel eelnevalt puhastada, kuid see oleneb konkreetsest puhastusjaamast. Pärast vee biotorni pumpamist jookseb see läbi filtersüsteemide ning koguneb uude mahutisse, kus vett juba edasi puhastatakse (Easter jt., 2005). Naftatööstuste reovee puhastamine on oluline, kuna sisaldab hulgaliselt erinevaid reoaineid, nagu fenoolsed- või alküülivad ühendid. Sellised ained on tihti toksilised ning põhjustavad bioreaktoris elavatele rakkudele stressi. Bakalaureusetöös tehtud katsete abil iseloomustasime isoleeritud bakteritüvede stressitaluvust ning muid omadusi, mis võiksid reovee degradeerimisel olulised olla. Ühtlasi uurisime nende tüvede potentsiaali bioaugmentatsiooniks, et bioremediatsiooniprotsesse efektiivsemaks muuta.

### **2.3.1 Fenooli minimaalse kasvu inhibeeriva kontsentratsiooni määramine**

Aromaatsed ühendid võivad rakkudes põhjustada erinevaid kahjustusi ning esile kutsuda stressivastust. Fenool ja teised aromaatsed ühendid kahjustavad rakumembraani, mistõttu häirub rakkude energiametabolism, suureneb ROS-ide hulk ning rakud surevad.

Selleks, et hinnata bakterite fenooli taluvust, määrati fenooli minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (MIC), mis näitab madalaimat kemikaali kontsentratsiooni, mille juures rakud pole enam võimelised kasvama. Biopuhastist isoleeritud tüvede fenooli taluvust võrreldi *P. putida* laboritüve PaW85 omaga, mida on kasutatud *P. putida* mudelorganismina nii meil kui mujal laborites. *P. putida* tüvi PaW85 on isogeenne teistes laborites kasutatava tüvega KT2440 (Regenhardt jt., 2002).



**Joonis 1.** Fenooli minimaalne kasvu inhibeeriv kontsentratsioon (MIC) erinevatel bakteritüvedel. Kõiki bakteritüvesid kasvatati M9 Glc+CAA söötmes. Joonisel on esitatud lainepikkudel 580 nm mõõdetud fenooli MIC-id. PaW85 on *P. putida* laboritüvi, teised tüved on isoleeritud biopuhastusjaama veest ja nende täpsem kirjeldus on antud “Metoodika” osas Tabelis 1. Esitatud on 3 katse keskmised tulemused 95% usalduspiiridega.

Joonisel 1 on võrreldud bakteritüvede vedelkultuuride optilise tiheduse erinevatel fenooli kontsentratsioonidel. Jooniselt on näha, et 20 mM kontsentratsiooniga fenooli juuresolekul rakud Glc+CAA söötmes kasvada ei suutnud ning kultuuride optiline tihedus jäi võrreldavaks algse optilise tihedusega (Vt. Lisa 2). Kaks kõige paremini fenooli taluvat tüve olid ICP24 ja IS10. Mõlemad kuuluvad perekonda *Bacillus*. Näha on, et mõni tüvi on ilma fenoolita kasvanud vähem kui fenooli lisamisel (näiteks tüved ICTN12, ICTN2). Võib oletada, et need tüved kasutavad lisaks glükoosile ka fenooli energia- ja süsinikuallikana. Kõige vähem fenooli talunud tüved olid *Acinetobacter*’ite hulka kuuluvad ICTN6a ja ICTN10. Saadud tulemused langevad hästi kokku Signe Viggori ning Merike Jõesaare tehtud katsete tulemustega, kus nad leidsid, et ICTN6a ja ICTN10 ei olnud võimelised fenooli süsinikuallikana kasutama, kuid tüved ICP24 ja IS10 suutsid fenooli kasutada (Vt. Tabel 1 töö “Metoodika” osas). S. Viggori ja M. Jõesaare katsetest selgus, et perekonda *Pseudomonas* kuuluvatest tüvedest on fenooli tardsöötmele substraadina kasutanud kõige edukamalt tüved ICTN4a, ICTN12, ICTN13, ICP3 ja ICP18 ja seda 5 mM fenooli korral. Käesolevas töös teostatud MIC katses kasvasid need tüved 10 mM fenooli juuresolekul. Põhjus, miks need tüved MIC katses ka juba 10 mM kontsentratsiooni juures kasvasid, võib olla selles, et MIC-i katsetes olid bakterite

kasvukeskkonnas lisaks glükoos ja CAA, mida nad said samuti süsiniku- ja energiaallikana kasutada. Nende kasvusubstraatide olemasolu keskkonnas võis anda bakteritele ka lisaressursse tulemaks toime fenoolist põhjustatud stressiga.

Fenool on toksiline ühend, mis kõrgel kontsentratsioonil on rakkudele letaalne või inhibeerib nende kasvu tugevalt. Näidatud on, et seda lagundada suutvaid bakteritüvesid leidub perekondades *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Acinetobacter* ja paljudes teistes (Marrot jt., 2006). Kõigi eelpool nimetatud nelja perekonna esindajaid on ka biojaamast isoleeritud bakteritüvede seas. Kõik isoleeritud tüved suutsid kasvada fenooli sisaldavas Glc+CAA vedelsöötmes. Siiski on näha, et hoolimata suutlikkusest fenooli lagundada, pärsib kõrgem kui 10 mM fenooli kontsentratsioon bakterite kasvu. Erandiks on tüved ICP24, ICP 18 ja IS10, mille puhul täheldasime teataval määral kasvu isegi 15 mM fenooli kontsentratsioonil.

Suurem osa tüvedest ei talunud kõrgemat fenooli kontsentratsiooni kui laboritüvi *P. putida* PaW85. Põhjuseks võib olla see, et paljud tüved, nagu ka PaW85 ei kasutanud fenooli kasvusubstraadina. Teiseks võib välja tuua, et paljud tüved on perekonnast *Pseudomonas*, nagu ka tüvi PaW85 ning sama perekonna esindajad käituvad tihti sarnaselt.

Kirjandusest on teada, et mikroobid suudavad energiaallikana kasutada korraga rohkem kui ühte substraati (Cases jt., 2005). Kui bakterirakul on võimalus valida mitme erineva energiaallika vahel, siis võivad nad substraate kasutada kas hierarhilises järjekorras või toimub kometabolism. Perekonna *Pseudomonas* esindajad on tuntud oma mitmekülgse metabolismi poolest. Glükoos ei mängi nende jaoks nii olulist rolli nagu näiteks *E. coli* puhul, kus glükoos põhjustab kataboliitset repressiooni. Näiteks glükoosi ja suktsinaadi puhul, kasutab *P. aeruginosa* esmalt suktsinaati ja seejärel glükoosi (Rojo, 2010). *Pseudomonas sp.* tüve CF600 puhul on näidatud, et kui kasvukeskkonnas on glükoosi või teisi suhkruid, mida süsinikuallikana kasutada, siis fenooli lisamisel söötmesse aktiveerub promootor Po, mis käivitab fenooli metabolismiraja geenide transkriptsiooni. See toetab fakti, et fenoolsete ühendite ja suhkrute lagundamisel toimub kometabolism (Sze jt., 1996; Viggor jt., 2008). Käesolevas töös uuritud bakteritüvede puhul võivad katsetulemused samuti kometabolismile viidata, kuna osade tüvede kultuurid (ICP1, ICTN2, ICTN12, ICP24) on ilma fenoolita Glc+CAA söötmes kasvanud väiksema optilise tiheduseni kui fenooli lisamisel.

### 2.3.2 pH taluvuse määramine

Bakterirakkude puhul on teada, et nad eelistavad kasvuks pigem neutraalset keskkonda. Näidatud on ka seda, et kõrgema pH-ga keskkondades on süsiniku kättesaamine kergem kui happelistes oludes (Bååth jt., 1992). Looduses on pH muutuv suurus, kuna seda mõjutavad nii maapinnas olevad ioonid, maha sadavad happevihmad kui ka kivimid, mis geoloogiliste protsesside tagajärjel lagunevad (Kurg jt., 1983). pH muutlikkuse tõttu peavad ka mikroorganismid kohanemisvõimelised olema, et ellu jääda.

*Ex situ* bioremediatsiooni meetodite puhul saab pH-d muuta. Biopuhastusseadmetes muudetakse või hoitakse pH taset vastavalt sellele, mis on rakkudele kasvuks kõige sobilikum. Sobilik pH muudab elukeskkonna rakkudele soodsamaks, mille tõttu suudavad nad kiiremini paljuneda ning reoaineid efektiivsemalt lagundada.

Käesolevates töös testiti bakteritüvede pH taluvust aluselises keskkonnas. Söötmetassidel reguleeriti pH-d lisades söötmesse vajalik kogus alust (NaOH) ning jälgiti rakkude kasvu söötmel. Võrdluseks oli kõrval *P. putida* hästiiseloostatud laboritüvi PaW85.

Tabelis 2 esitatud andmete põhjal saab järeldada, et suurem osa bakteritüvedest taluvad hästi aluselist keskkonda. Kuna tüved on isoleeritud biopuhastist, mille pH-d on võimalik optimaalsemaks reguleerida, siis saame väita, et suurem osa rakkudest jäävad ellu ka siis, kui seal keskkond aluseliseks muudetakse. Kõrgemat pH taset (pH 10) ei talu tüved ICP24 ja IS10 (perekonnast *Bacillus*), ICTN5 ja ICTN11 (perekonnast *Pseudomonas*) ning ICTN17 (perekonnast *Cellulomonas*). Kõige paremini taluvad kõrgemat pH-d aga tüved ICTN4a ja ICTN3, hakkama saavad ka IS5, ICP3, ICP18, ICTN6a, ICTN10, ICTN1, ICTN2, ICTN13 ja ICTN2. Seega oleks enamusel bakteritüvedest potentsiaali, kui kasutada neid bioremediatsioonil, kus keskkonna pH on aluseliseks muudetud vahemikus pH 8-9.

**Tabel 2. pH taluvuse määramine<sup>a</sup>**

| <b>TÜVI</b>   | <b>pH = 8</b> | <b>pH = 9</b> | <b>pH = 10</b> |
|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>ICTN11</b> | +++           | +++           | -              |
| <b>ICTN2</b>  | +++           | +++           | +              |
| <b>ICTN5</b>  | +++           | ++            | -              |
| <b>ICTN13</b> | +++           | +++           | ++             |
| <b>ICTN4a</b> | +++           | +++           | +++            |
| <b>ICTN12</b> | +++           | +++           | ++             |
| <b>ICTN1</b>  | +++           | +++           | ++             |
| <b>ICTN17</b> | +             | ++            | -              |
| <b>ICTN10</b> | +++           | +++           | ++             |
| <b>ICTN6a</b> | +++           | ++            | +              |
| <b>ICP24</b>  | +++           | ++            | -              |
| <b>ICP18</b>  | +++           | +++           | ++             |
| <b>ICP3</b>   | +++           | +++           | ++             |
| <b>IS5</b>    | +++           | +++           | ++             |
| <b>IS10</b>   | +++           | ++            | -              |
| <b>ICTN3</b>  | +++           | +++           | +++            |
| <b>ICP1</b>   | +++           | ++            | +              |
| <b>PaW85</b>  | +++           | ++            | +              |

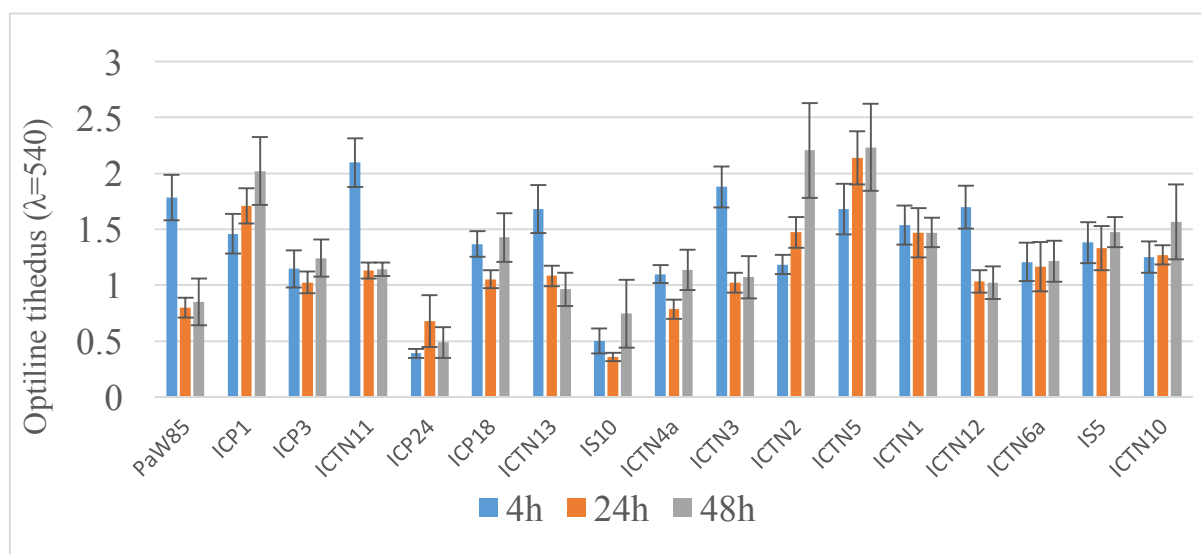
<sup>a</sup>Hinnatud on biopuhastist isoleeritud bakteritüvede ning laboritüve *P. putida* PaW85 kasvu erineva pH-ga söötmetel. Kasvu hinnati järgnevalt: tugev kasv (+++), mõõdukas kasv (++), kesine kasv (+) ning kasv puudub (-).

Uuritud on ka seda, kuidas mõjutab fenooli degradeerimisvõimelisi rakke pH tase ning temperatuur. On leitud, et fenooli lagundamiseks on kõige sobilikum temperatuur 30°C (Sá jt., 2001), mille juures on ka kõiki meie bakteritüvesid iga katse puhul inkubeeritud. Sobiliku pH taseme puhul on nähtud kahte erinevat optimumi. Näiteks *P. putida* tüve CCRC14365 kaltsium-alginaathappe maatriksil immobiliseeritud rakkude pH optimum fenooli lagundamiseks oli 6,8 ning vabalt elanud rakkude puhul 8,0; kõrgemate pH-de korral degradatsiooni efektiivsus langes (Chung jt., 2003). Meie katsetulemustest selgus, et kõikide isoleeritud bakteritüvede, v.a. ICTN17 puhul, on kasv pH = 8 korral tugev, mis tähendab, et bioreaktoris võiksid pH = 8 korral rakud fenooli degradeerida. Isegi kui bioreaktoris pH taset tõsta, on katsetulemustest näha, et rakud on ka siis eluvõimelised ja suudavad fenoolseid ühendeid lagundada.



### 2.3.3 Biofilmi moodustamise võime biopuhastist isoleeritud bakteritüvedel

Uuritavad tüved on eraldatud läbivoolusüsteemiga biopuhastist, kus bakterid moodustavad biofilmi, mis on nende üheks põhiliseks viisiks pindadele kinnituda. Läbivoolusüsteemidesse püsima jäämiseks on rakkude pinnale kinnitumine olulise tähtsusega, millest tulenes ka vajadus mõõta käesolevas töös uuritavate bakteritüvede biofilmi moodustamise võimet. Biofilmi moodustumine sõltub bakterite kasvutingimustest ja erinevad bakterid võivad moodustada biofilmi erineva efektiivsusega.



**Joonis 2.** Biofilmi moodustumine erinevatel bakteritüvedel. Võrreldud on *P. putida* laboritüve PaW85 ja biopuhastist isoleeritud tüvede biofilmi moodustamise võimet erinevatel ajapunktidel. Biofilmi moodustamist hinnati mikrotiiterplaadile kinnitunud rakkude värvimisel kristallvioletiga. Värv eemaldati 96% etanooliga ja neeldumist mõõdeti lainepikkusel 540 nm. Esitatud on kolme katse keskmised tulemused 95% usalduspiiridega.

Biofilmi moodustumisel on 5 etappi. Alguses kinnituvad üksikud rakud mingile valitud pinnale. Kui rakke kohe sellelt pinnalt ei eemaldata, järgneb veel tugevam kinnitumine, näiteks piilide või flagella abil. Kinnitunud bakterid hakkavad saatma ning vastu võtma signaale, mis kutsuvad kohale teised rakud ning nad moodustavad ühise biofilmi. Moodustunud biofilmi maatriks kaitseb rakke ning biofilm üha kasvab. Lõpuks biofilm laguneb ning bakterid vabanevad, et koloniseerida uusi pindasid (Costerton, 1999). Joonisel 2 on võrreldud biofilmi moodustamise võimet, mida mõõdeti erinevatel ajahetkedel. Valisime erinevad ajapunktid, kuna uuritavate tüvede puhul polnud meil teada, kui kiiresti ja efektiivselt nad biofilmi moodustavad. Tulemustest nägime, et tüved käituvad erinevalt. Tüved nagu ICTN11 ja ICTN3 moodustavad

biofilmi kiiresti, samas tüved ICTN2 ja ICP1 aeglaselt. Samuti on tüvesid, nagu näiteks ICTN1 ja ICTN6a, kes moodustavad biofilmi igas uuritud ajapunktis võrdse efektiivsusega. Kuna tegu on läbivoolusüsteemiga, võib oletada, et kõige edukamalt suudavad bioreaktorisse kinnituda kiiremini biofilmi moodustavad bakteritüved. Oluline on ka reaktoris püsimine, mistõttu pean isoleeritud tüvedest bioaugmentatsiooniks kõige suurema potentsiaaliga neid tüvesid, mis kuuluvad gruppi, kus biofilmi moodustatakse enam-vähem võrdselt igal mõõdetud ajahetkel. Testitud tüvedest kuuluvad sellesse rühma ICP18, ICTN4a, ICTN1, IS5 (*Pseudomonas sp.*) ning ICTN6a (*Acinetobacter sp.*).

Biofilmi moodustamine bioreaktorites aitab bakteritel ksenobiootikume paremini lagundada, kuna maatriks, mis rakke biofilmis ümbritseb, kaitseb neid keskkonnas olevate rakkudele kahjulike ühendite toime eest (Singh jt., 2006). Meie uurisime, millised bakteritüved biofilmi kõige rohkem moodustavad ning missugustel ajahetkedel. Leidsime, et valdav osa *Pseudomonas sp.* tüvedest käituvad sarnaselt ehk moodustavad biofilmi pigem kiiresti ning 24. tunni möödudes on osa sellest juba ära lagunened. Seda toetab kirjandus, sest on leitud, et *Pseudomonas aeruginosa* moodustab biofilmi 10 tunniga (Harrison-Balestra jt., 2003). Siinkohal tuleb mõista, et sööde, millel rakke kasvatati (antud katses Glc+CAA), on biofilmi moodustumise sisukohalt väga oluline. Erinevates tingimustes muutub ka bakterite poolt moodustatava biofilmi hulk. Kuna tüvesid oli palju, oli katse üheks eesmärgiks ka näha, millised tüved rohkem biofilmi moodustada võiksid, et tulevikus saaks neid teistel söötmetel ja lõpuks läbivoolusüsteemis testida. Võttes arvesse oletust, et läbivoolusüsteemiga puhastusjaamas tagab püsima jäämise kiire kinnitumine biotorni filtertäidisele, siis võrreldes *P. putida* tüve PaW85-ga ei moodusta 4 tunni jooksul statistiliselt oluliselt rohkem biofilmi mitte ükski tüvi. Oluliselt vähem moodustavad aga tüved ICP3, ICP18, ICTN4a, IS5 (*Pseudomonas sp.*), ICP24, IS10 (*Bacillus sp.*), ICTN2, ICTN6a, ICTN10 (*Acinetobacter sp.*). 24 tunni jooksul moodustasid paljud biopuhastist isoleeritud tüvedest võrreldes *P. putida* laboritüvega PaW85 statistiliselt oluliselt erineval määral biofilmi ( $p < 0,05$ ). Sellised tüved olid ICTN11, ICTN5, ICTN1, IS5 (*Pseudomonas sp.*), ICP1, ICTN2, ICTN6a, ICTN10 (*Acinetobacter sp.*) ja IS10 (*Bacillus sp.*). 48. tunnil mõõdetud biofilmi kogus sarnanes 24. tunnil mõõdetule ehk statistiliselt oluline erinevus PaW85 biofilmi hulgast ilmnas tüvedel ICP18, ICTN5, ICTN1, IS5 (*Pseudomonas sp.*), ICP1, ICTN2 ja ICTN5 (*Acinetobacter sp.*), kes moodustasid võrreldes *P. putida* laboritüvega PaW85 rohkem biofilmi. Biopuhastusjaamast isoleeritud tüvesid võrreldi laboritüvega *P. putida* PaW85, kuna viimase võimekust biofilmi moodustada on varem uuritud (Tolker-Nielsen jt., 2000; Jakovleva jt., 2012).

Biofilmi moodustamine on liikumise vastand (Costerton, 1999), kuid samas on täheldatud, et liikumine ning flagella olemasolu on rakkudele ülioluline biofilmi moodustamiseks. Näiteks on uuritud *P. aeruginosa* mutantset tüve PA14, kellel puuduvad korrektsed viburid ja piilid, mis aitaksid tal kinnituda. Sellised rakud ei suutnud biofilmi moodustada (O'Toole jt., 1998). Perekonna *Acinetobacter* esindajate seas on aga näidatud, et neil puuduvad flagellad ning on seega liikumisvõimetud (Bergogne-Berezin jt., 1996). Meie katses ei ole liikumisvõimelistel *Pseudomonas sp.* tüvedel ning liikumisvõimetutel *Acinetobacter sp.* esindajate biofilmi moodustamise osas erilist vahet. Seda, kas meie katses olnud *Acinetobacter sp.* tüvede puhul võib olla geneetilisi erinevusi võrreldes eelpool mainitud artiklis uuritud *Acinetobacter*'i tüvedega, mis mõjutavad biofilmi teket, ei suuda me antud töö raames öelda. Samas võib kirjandusest leida ka artikleid, kus on näidatud, et liikumisvõime ei ole alati biofilmi moodustamise suhtes oluline. Näiteks viburiteta *P. putida fliM* mutant suudab läbivoolukultuuris biofilmi moodustada metsikütüvega võrdselt (Gjermansen jt., 2005). Meie katses kasutatavad bakteritüved on samuti isoleeritud läbivoolusüsteemiga biopuhastist, mis annab alust oletada, et biofilmi moodustamist mõjutab kuidagi ka läbivoolusüsteem. Kuidas täpselt, seda pole antud bakalaureusetöös uuritud.

#### **2.3.4 Antibiootikumide resistentsuse testimine isoleeritud tüvedel**

Resistentsust antibiootikumidele põhjustavad mutatsioonid genoomis või resistentsusgeenide horisontaalne ülekande. Stressirohke keskkond võib soodustada mutatsioonide teket, mis tagavad antibiootikumide resistentsuse. Selliste bakteritüvede laialdane levik looduses oleks inimeste ja loomade jaoks kahjulik, kuna infektsioonide ravimine antibiootikumidega muutuks võimatuks. Seepärast on oluline uurida, kas biopuhastist isoleeritud bakteritüvedel on tekkinud resistentsust antibiootikumidele, mis võiks osutada probleemiks seoses antibiootikumide resistentsuse levikuga.

Katses testiti bakteritüvede suutlikkust kasvada kuue erineva antibiootikumi juuresolekul, mis olid lisatud LB söötmesse. Kuna osa bakteritüvesid kasvasid LB söötmel võrreldes teistega aeglasemalt, kasvatati kõiki 48 tundi, et tagada võrreldavad tulemused.

**Tabel 3. Antibiootikumide resistentsuse testimine isoleeritud tüvedel<sup>a</sup>**

|                | <b>Tet</b>   | <b>Gm</b>       | <b>Rif</b>   | <b>Amp</b>   | <b>Bp</b>      | <b>Sm</b>       | <b>Km</b>       |
|----------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                | <b>100</b>   | <b>60 µg/ml</b> | <b>100</b>   | <b>100</b>   | <b>3 µg/ml</b> | <b>40 µg/ml</b> | <b>50 µg/ml</b> |
|                | <b>µg/ml</b> |                 | <b>µg/ml</b> | <b>µg/ml</b> |                |                 |                 |
| <b>ICTN 11</b> | -            | -               | -            | +            | +              | -               | +               |
| <b>ICTN 2</b>  | +            | -               | -            | +            | -              | -               | -               |
| <b>ICTN 5</b>  | -            | -               | -            | -            | -              | -               | -               |
| <b>ICTN 13</b> | -            | -               | -            | +            | -              | -               | -               |
| <b>ICTN 4a</b> | -            | -               | -            | +            | -              | -               | -               |
| <b>ICTN 12</b> | -            | -               | -            | +            | -              | -               | -               |
| <b>ICTN 1</b>  | -            | -               | -            | +            | -              | -               | +               |
| <b>ICTN 17</b> | -            | +               | -            | -            | -              | -               | -               |
| <b>ICTN 10</b> | -            | -               | -            | +            | -              | -               | -               |
| <b>ICTN 6a</b> | -            | -               | -            | -            | -              | -               | -               |
| <b>ICP 24</b>  | -            | -               | -            | -            | -              | -               | -               |
| <b>ICP 18</b>  | -            | -               | -            | +            | -              | -               | -               |
| <b>ICP 3</b>   | -            | -               | -            | +            | -              | -               | -               |
| <b>IS 5</b>    | -            | -               | -            | +            | +              | -               | +               |
| <b>IS 10</b>   | -            | -               | -            | -            | -              | -               | -               |

<sup>a</sup>Bakteritüvede suutlikust kasvada erinevate antibiootikumide juuresolekul vaadeldi 48 tunni jooksul pärast nende külvamist. Antibiootikumid lisati LB tardsöötmetele ning pärast rakkude külvamist söötmetele inkubeeriti rakukultuure temperatuuril 30°C.

Tabelis 3 on näha, et antibiootikumide resistentsus ei ole uuritud bakteritüvede puhul levinud; me ei leidnud ka bakteritüvesid, kellel oleks tekkinud multiresistentsust. Kõige rohkem nägime resistentsust ampitsilliini suhtes.

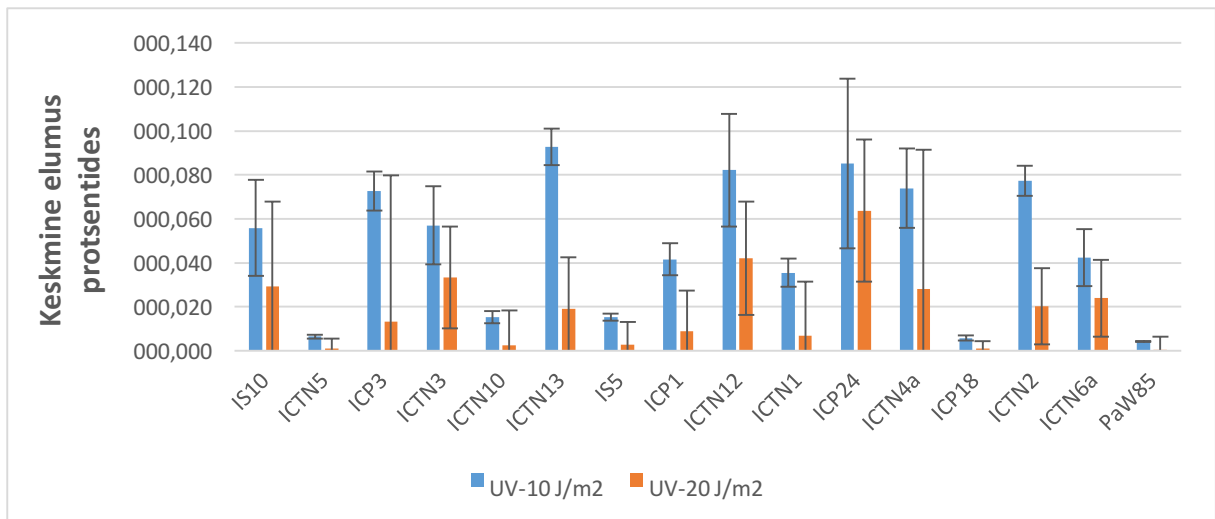
Antibiootikumide resistentsuse levik on meditsiini vaatepunktist üha kasvav probleem. Antibiootikume kasutatakse palju nii veterinaarias, meditsiinis kui ka põllumajanduses, mistõttu sattuvad need ühendid ühel või teisel moel keskkonda (Brown jt., 2006). Peamine mure seoses antibiootikumide keskkonda kuhjumisega on resistentsusgeenide levik ning multiresistentsete bakterite teke (Kümmerer, 2009). Näiteks olmevee puhastitest isoleeritud

bakteritüvede seas olid esindatud kõik bakteritele antibiootikumide resistentsust tagavad mehhanismid ning resistentsete bakteritüvede hulk oli väga kõrge (Rizzo jt., 2013). Antud katses ei ole bakteritüvede seas väga palju antibiootikumide resistentsust näha. Erinevus tuleb tõenäoliselt sellest, millisel otstarbel biopuhastit kasutatakse. Antud biopuhasti on naftatööstuse reovee puhastamiseks, kuhu antibiootikume ei peaks olema sattunud. Kui suurt hulka antibiootikume keskkonnas pole, puudub bakteritel seleksioon resistentsuse omandamiseks. Suuremal osal isoleeritud bakteritüvedest esineb aga ampitsilliini suhtes resistentsus. Näidatud on, et bakteritel, nagu *Pseudomonas sp.* esindajatel on multiresistentust tagavad väljavoolupumbad, millega antibiootikume tagasi keskkonda pumbata. *Pseudomonas aruginosa* on tuvastatud kolm väljavoolupumpa: MexAB-OprM, MexCD-OprJ ja MexEF-OprN, millest juba vaid esimese ekspresseerimine tagab piisava kaitse osade antibiootikumide suhtes. Pumbad tagavad resistentsuse ka ampitsilliini suhtes (Lomovskaya, 1999). Seetõttu ei ole suur ampitsilliini resistentsuse esinemine meie katses erakordne nähtus.

### **2.3.5 Biopuhastist isoleeritud bakteritüvede toimetulek DNA-kahjustustega**

Väliste tegurite põhjustatud DNA kahjustuste hulka kuuluvad näiteks UV-kiirguse tekitatud kahjustused. UV-kiirgus põhjustab DNA ahelas katkeid ning kovalentseid ristsidemeid pürimidiinide vahel. Suure hulga kahjustuste korral kutsutakse rakus esile stressivastus, mis aitab rakul ellu jääda. Üheks selliseks on SOS-vastus (Sutton, 2000). Ehkki bioreaktori suletud süsteemis rakud UV-kiirgusega kokku ei puutu, tahtsime me näha, kuidas isoleeritud bakteritüved SOS-vastusega toime tulevad, sest lisaks UV-kiirgusele põhjustavad DNA kahjustusi ka teised tegurid. Näiteks võivad SOS-vastust põhjustada ka erinevad alküülivad ühendid ning ROS-id.

DNA kahjustustega toimetuleku hindamiseks kiiritati rakke erineva tugevusega UV-C kiirgusega. Katse eesmärgiks oli vaadata, kas stressirohkes keskkonnas elavad bakteritüved on DNA kahjustustega toimetuleku osas rohkem kohastunud kui laboritüvi PaW85.



**Joonis 3.** Erinevate bakteritüvede DNA kahjustuste talumisvõime. Testitud on bakterite UV-kiirguse talumist erinevatel UV-C kiirguse doosidel. Võrreldud on *P. putida* laboritüve PaW85 elumust protsentes biopuhastist isoleeritud bakteritüvede elumusega kahe erineva UV-C kiirguse doosi korral. Toodud on 3 sõltumatu katse 2 paralleeli keskmised väärtused 95% usalduspiiridega. (Arvulised väärtused on esitatud Lisa 1 peatükis “LISAD”).

Joonisel 3 on näha, et valdav enamus isoleeritud bakteritüvedest saab UV-kiirguse põhjustatud DNA kahjustustega paremini hakkama kui *P. putida* tüvi PaW85. Võib öelda, et stressirohkes keskkonnas ellu jäämiseks on isoleeritud bakterirakud suutelised DNA-kahjustustega paremini toime tulema.

SOS-vastuses puhul on olulised Y-perekonna DNA polümeraasid pol IV ja pol V (Ling jt., 2001). Nii pol V kui ka pol IV suurendavad mutatsioonisagedust, kuna nad sünteesivad DNA-d vigaderohkelt. Kui pol V geenid deleteerida, siis väheneb SOS vastusega kaasnev mutagenees; pol IV geeni deleteerimine aga mutatsioonisagedust nii palju ei mõjuta (Sundin jt., 2007). *P. putida* laboritüvel PaW85 puudub pol V. Võimalik, et seetõttu on ta ka tundlikum UV-kiirguse suhtes. Meie laboris on varem näidatud, et pol V geenide viimisel bakterisse *P. putida* PaW85 suureneb sellel tüvel oluliselt UV-kiirguse talumisvõime ja ka mutatsioonisagedus UV-kiirguse ja teiste DNA-d kahjustavate tegurite puhul (Tark jt., 2005). Suurem UV-kiirguse taluvus isoleeritud bakteritüvedel võrreldes *P. putida* laboritüve PaW85 viitab sellele, et neil võiks olla olemas pol V või mõni teine DNA kahjustuste taluvust suurendav DNA polümeraas.

Lisaks võib kirjandusest veel leida, et UV-kiirguse suhtes on *P. aeruginosa* ning *B. subtilis* üsna kõrge taluvusega. Seda seletatakse *P. aeruginosa* puhul faktiga, et paljudel *Pseudomonas*

*sp.* esindajatel ongi kõrge resistentsus nende plasmiidides asuvate pol V geenide tõttu ning *Bacillus sp.* bakteritüved suudavad ebasoodsates tingimustes spoores moodustada, mis aitavad raskeid tingimusi üle elada (Hassen jt., 2000). Meie katsete tulemustest on näha, et suuremal osal *Pseudomonas sp.* ning *Bacillus sp.* tüvedest on kõrge UV-taluvus ehkki *Bacillus sp.* puhul meie katses tõenäoliselt spoores ei moodustunud, kuna me ei loonud selleks vastavaid tingimusi.

### 2.3.6 Mutaatorite olemasolu biopuhastist isoleeritud bakteritüvede hulgas

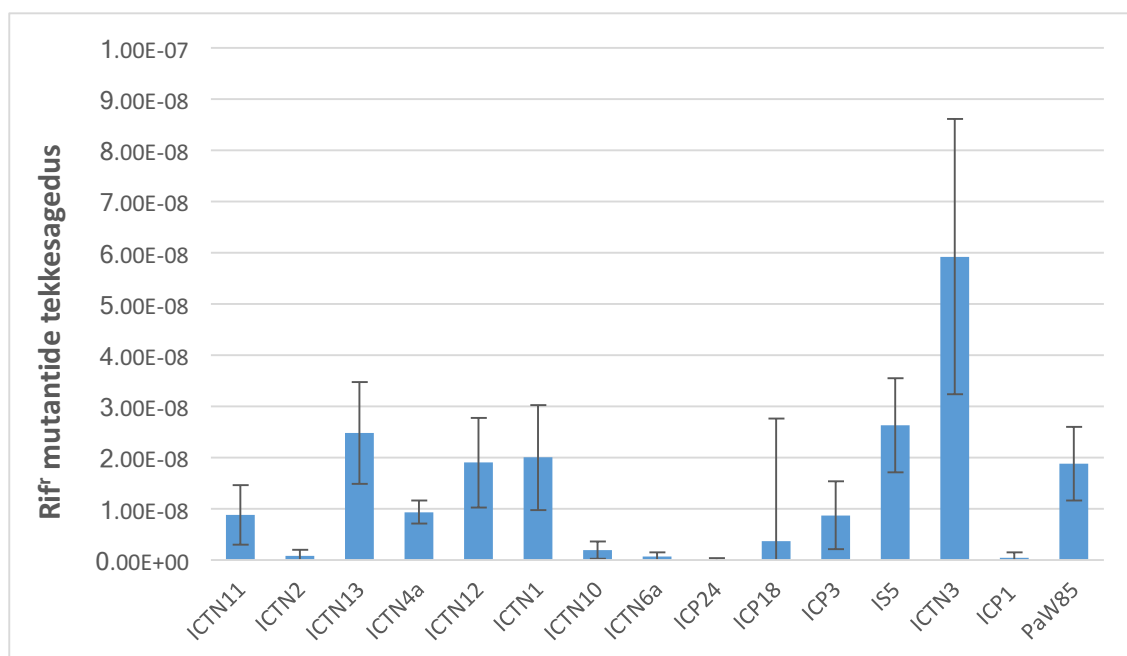
Mutatsioonid võivad bakteritel tekkida näiteks sellises keskkonnas, kus nad on selektiivse surve all. Laboritingimustes saab spontaansete mutatsioonide tekkimist tuvastada näiteks antibiootikumi suhtes resistentsete mutantide arvukuse määramise kaudu rakupopulatsioonis isoleerides mutante antibiootikumi sisaldaval selektiiv söötmel (Compeau jt., 1988). Looduslik keskkond, kus bakterid elavad, sisaldab erinevaid neile kahjulikke ühendeid ning bakterid kas kohanevad või surevad. Spontaanselt tekkinud mutatsioonid võivad anda bakteritele näiteks suutlikkuse kasutada uut ühendit süsinikuallikana või tagavad resistentsuse mingi antibiootikumi vastu, seega anda mingi iseloomuliku tunnuse, mis muudab bakteri antud kasvukeskkonna suhtes kohasemaks. Kohasust suurendavaid ehk kasulikke mutatsioone tekib aga palju harvem kui kahjulikke. Kuna suure tõenäosusega on tekkivad mutatsioonid kohasust vähendavad, on rakkudes mutatsioonisagedust pigem madalal (Sniegowski jt., 1997; Drake, 1991). Selle madalal hoidmiseks on rakkudel mitmeid mehhanisme, näiteks toimivad DNA reparatsioonisüsteemid ning DNA-d kaitsvate geenide produktid, mis eemaldavad või ennetavad muutusi DNA struktuuris (Giraud jt., 2001).

Toksilisi ühendeid sisaldav keskkond, kus bakterid reovee puhastusjaama mahutites elavad, on bakteritele stressi tekitavad. Stressitingimustes võib bakterite mutatsioonisagedus suureneeda, kuna muutlikes oludes võidakse eelistada baktereid, kes suudavad kiiremini kohaneda. Seega on tugev selektiivne surve see, mis mutatsioonisageduse tõusu olulisel määral mõjutab (Ryall jt., 2012). Selline efekt on eriti hästi välja tulnud infektsiooni põhjustavate bakterite puhul. Näiteks uuriti tsüstilist fibroosi põdevatelt patsientidelt isoleeritud *P. aeruginosa* tüvesid. 128-st tüvest olid mutaatorfenotüübiga 19,5% ehk 25 tüve (Oliver jt., 2000).

Mutaatoreid on kahte tüüpi. (Oliver jt., 2000) katses oli kirjeldatud konstitutiivseid mutaatoreid. Enamasti leiti mutaatoritelt defektne *mutS* geen, mille tõttu ei saa DNA valepaardumise reparatsioonitorada (MMR; ingl. k. *mismatch repair*) töötada, aga oli ka defektse *mutY* geeniga

tüvesid. MutY-defektsetes tüvedes ei toimu oksüdatiivsete kahjustuste parandamine nii nagu peaks. Teist tüüpi mutaatorid on sellised, kelle mutatsioonisageduse tõus on ajutine ning põhjustatud vastusena stressile (Ryall jt., 2012; Foster, 2007). Stressivastuseid on erinevaid, näiteks SOS-vastus (Sutton, 2000), „poomisvastus” (Gourse jt., 2007) või üldine stressivastus (Foster, 2007).

Antud katse eesmärgiks oli uurida spontaansete mutatsioonide tekkesagedust, et selgitada, kas isoleeritud bakteritüvede seas on konstitutiivseid mutaatoreid ehk konstitutiivselt suurenenud mutatsioonisagedusega baktereid, millel on potentsiaali stressirohkes keskkonnas kiiremini evolutsioneeruda.



**Joonis 4.** Spontaanne mutatsioonisagedus erinevatel bakteritüvedel. Mõõdetud on Rif mutantide tekkesagedust ja esitatud mediaan-väärtused *P. putida* PaW85 ning biopuhastist isoleeritud tüvede puhul. Iga tüve puhul on esitatud kolme sõltumatu katse 15 paralleeli mediaanväärtused koos 95% usalduspiiridega.

Joonisel 4 näeme isoleeritud bakteritüvede ning *P. putida* PaW85 laboritüve mutatsioonisagedusi. Selgus, et kõikidest katsetesse võetud tüvedest olid *P. putida* laboritüve PaW85 suhtes statistiliselt oluliselt madalama ( $p$ -väärtus  $< 0,05$ ) mutatsioonisagedusega tüved ICP1, ICTN10, ICTN2, ICTN6a (*Acinetobacter* sp.), kuid statistiliselt oluliselt kõrgema mutatsioonisagedusega tüvesid ei olnud. ICP24 mutatsioonisagedus oli niivõrd madal, et jäi allapoole kasutatud meetodika detekteerimispiiri. Seni on uuritud patogeenseid bakteritüvesid ja leitud, et suur hulk neist on mutaatorfenotüübiga (Oliver jt., 2000). Inimesele patogeensete



tüvede puhul võib suurt mutaatorite esinemise sagedust põhjustada tugev selektiivne surve, mis tekitatakse patsientidele erinevate ravimite manustamisega. Infektsioonikoldes on rakud üsna tihedalt koos, mis võib viia ka selleni, et mutaatorite geenid levivad populatsioonis edasi. Seda, kas reoaineid lagundavate bakteritüvede puhul võib mutaatorite osakaal samuti suur olla, pole uuritud.

Antud bakalaureusetöös läbi viidud katse tulemused viitavad reostunud keskkonnast isoleeritud bakteritüvede madalale mutatsioonisagedusele. Erinevalt patogeensetest tüvedest, mille põhjustatud infektsioone ravitakse üldiselt sarnase koostisega ravimitega, elavad keskkonnatüved väga muutlikes tingimustes, kus võib olla rohkem kasvuperioode ja sellest tulenevalt on ka põlvkondade arv suurem. Pidevalt kõrge mutatsioonisagedus on pikemas perspektiivis kahjulik, kuna sel juhul võib suurened ka bakterite kohasust vähendavate mutatsioonide hulk ja mutaatorid kaovad populatsioonist. See võib olla ka üheks põhjuseks, miks keskkonnatüvede puhul on konstitutiivsete mutaatorite esinemissagedus populatsioonis madalam. Samas ei saa me välistada võimalust, et nendel tüvedel võib suurened mutatsioonisagedus ajutiselt. Seda küll antud töös ei testitud, kuid nagu juba eespool mainitud, talusid enamus bakteritüvesid DNA kahjustusi paremini võrreldes *P. putida* laboritüvega PaW85, millel puudub DNA polümeraas pol V (Joonis 3). Pol V olemasolul suureneb rakkude DNA kahjustuste korral mutatsioonisagedus (Kuban jt., 2006). Pol V ja teised Y-perekonna polümeraasid viivad läbi DNA kahjustustest ülesünteesimist (ingl. k. *translesion DNA synthesis*; TLS) (Friedberg jt., 2002). Y-perekonna polümeraasid omavad teistelegi polümeraasidele iseloomulike jooni, kuid erinevus on nende aktiivtsentris. Nende aktiivtsenter on rohkem avatud, mis tähendab, et ka ebakorrekse modifikatsiooniga nukleotiidid mahuvad sinna sisse ära ning DNA kahjustuste korral, kus replikatiivne DNA polümeraas ei ole võimeline DNA sünteesi jätkama, jätkavad seda TLS polümeraasid, kuid sel juhul võib DNA süntees olla vigaderohke, suurendades mutatsioonisagedust (Yang, 2003).

## Kokkuvõte

Tööstuslikud jääkained, nagu aromaatsed ühendid on inimestele ohtlikud, mistõttu on nende lagundamise uurimisse viimastel aastatel palju panustatud. Bioremediatsiooni peetakse üheks odavaimaks ning keskkonnasõbralikumaks meetodiks. Bioremediatsioonivõime on tagatud bakterite võimega kiiresti evolutsioneeruda ning omandada uusi kataboolseid radu lagundamiseks keskkonnale võõraid jääkaineid.

Bakterite ellujäämine toksilisi saasteaineid sisaldavad keskkonnas sõltub suuresti nende võimest kohaneda erinevate stressitingimustega. Kohanemisele aitab kaasa suurenenud mutatsioonisagedus ning rakkudes toimuvad protsessid.

Bakalaureusetöö teoreetilises osas andsin ülevaate bioremediatsiooni olemusest ning selle alla kuuluvatest erinevatest tehnoloogiatest. Peale selle seletasin lahti oksüdatiivse stressi tagamaad ning selle tekkimise põhjused. Lisaks käsitlesin erinevaid stressivastuseid, mida bakterid ebasoodsates tingimustes ellu jäämiseks kasutavad.

Töö eksperimentaalses osas iseloomustasin India õlitöötluskompleksi Uran FTP heitvee puhastusjaamast Signe Viggori ja Merike Jõesaare poolt isoleeritud bakteritüvesid. Selgitasin isoleeritud bakteritüvede stressitaluvust (pH muutuste ja DNA kahjustuste taluvus) ning uurisin, kas sealne stressirohke keskkond on soodustanud mutaatorite teket. Kuna biopuhasti puhul oli tegemist biotorniga (ingl. k. *biotower*), mille filtertäidilsele bakterid biofilmi moodustades kinnituda saavad, uurisin tüvede biofilmi moodustamise võimet. Samuti selgitasin välja ega isoleeritud bakteritüvede hulgas ei ole antibiootikumidele resistentseid tüvesid.

Bakalaureusetöö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. Suurem osa tüvedest, kes suudavad fenooli süsinikuallikana kasutada, said fenooli sisaldavad keskkonnas paremini hakkama kui need, kes seda ei lagunda.
2. Kõik tüved on võimelised ellu jääma pH 8 – pH 9 korral, suurem osa uuritud tüvedest suudavad kasvada ka pH = 10 juures, mis tähendab, et biopuhastis võiks bioremediatsiooni läbi viia ka aluselises keskkonnas.
3. Kõik uuritud tüved moodustasid biofilmi, mis viitab sellele, et nad suudavad biotornis olevatele pindadele kinnituda ning sinna püsima jääda.

4. Antibiootikumide resistentsus ei ole biopuhastist isoleeritud tüvede seas levinud; me ei leidnud multiresistentseid bakteritüvesid. Oht resistentsuse levikuks väljaspoole biopuhastit on seega minimaalne.
5. Toimetulek DNA kahjustustega oli isoleeritud tüvedel väga efektiivne, mis viitab sellele, et neil võiks olla mitmeid mooduseid stressiga toimetulekuks, kaasa arvatud Y-perekonna polümeraaside olemasolu.
6. Erinevalt patogeensetest tüvedest, mis pärinevad infektsioonikolletest, on reoainetega saastunud keskkonnast isoleeritud tüvede seas konstitutiivsete mutaatorite osakaal madal. Meie poolt uuritud bakteritüvede hulgas mutaatoreid ei leidunud.

# **Stress tolerance of bacteria degrading oil industry wastewater compounds**

## **Resume**

Angela Peeb

Industrial wastewaters contain pollutants such as aromatic compounds that are hazardous for people which is the main reason why researching how to degrade them has gained more attention over the past few years. Bioremediation is a cheap and an economical method which is based on use of microbial ability to evolve fast and gain new catabolic pathways to degrade unnatural pollutants.

Although the degradation capacity of bacteria is an indispensable element in reducing environmental pollution, its mere existence is not enough. The unpredictability of bioremediation comes from understanding of the behaviour of microbial populations in natural environments and how physical, biological and chemical factors control their activity against environmental pollutants. It is obvious that bacteria in open environments often need to face up to multiple stressors. Environmental stressors limit microbial activities, and therefore also the use of microbes in the removal of pollutants both in soils and in wastewater treatment plants. Thus, defining bacterial stress responses will help to overcome a number of conceptual and technical problems encountered in bioremediation and will provide valuable know-how on the treatment of pollution via knowledge-based biotechnology.

Another important aspect in biodegradation is that under selective pressure exerted by pollutants, microbes can develop the capacity to degrade recalcitrant xenobiotics. It has been documented that bacteria are able to evolve rapidly new catabolic pathways as a result of horizontal transfer of genes and point mutations that broaden the substrate range of pre-existing enzymes. Mutator alleles can spread in bacterial populations by hitchhiking because mutators are in frequency. For example, hypermutators can be isolated from populations of a variety of human pathogens at frequencies ranging from 1% to 58% of total population. Whether the survival and evolution of organic pollutants degrading indigenous bacteria could also be connected with mutator phenotype is still unexplored.

In the literature review of this study I gave an overview of the bioremediation and different methods for using it. I also described stress responses that bacteria use for surviving. The aim of the experimental part was to characterize bacterial strains isolated by Signe Viggor and Merike Jõesaar from wastewater samples from crude oil refinery complex Uran FTP wastewater biotower (Mumbai, India). I characterized the stress tolerance (pH change tolerance and DNA damage tolerance) of isolated bacterial strains and investigated whether stressful environment could have stimulated appearance of mutators among bacteria isolated from wastewater treating plant. In addition, since bacterial strains were isolated from bioreactor in which bioremediation process occurs in fixed-film biotower, I studied the ability of bacterial strains to form biofilm. Spread of resistance to antibiotics among the isolated bacterial strains was investigated as well.

The results of my study can be summarized as follows:

1. Majority of isolated bacterial strains, which are able to use phenol as a carbon source, showed better growth in higher phenol concentrations in comparison with those which do not degrade phenol.
2. All isolated bacterial strains were capable of living at pH 8 – pH 9, majority of them survived at pH = 10 as well, which indicates that bioremediation in bioreactor could also be executed in more alkaline conditions.
3. All isolated bacterial strains formed biofilm, which indicates that they are able to remain in bioreactor by anchoring themselves on the surface of biotower.
4. Resistance to antibiotics was not common among isolated bacterial strains; any of the strains were multiresistant. Therefore, a potential risk of resistant strains spreading outside of the bioreactor is minimal.
5. Isolated bacterial strains coped with DNA damage rather well, which indicates that they might have several mechanisms to protect themselves, e.g., due to the presence of Y-family polymerases capable of translesion DNA synthesis.
6. Monitoring the presence of mutators among bacterial strains isolated from wastewater treatment plant by measuring spontaneous Rif<sup>r</sup> mutation frequency indicated that constitutively increased mutability has not been prevalent in the evolution and/or persistence of bacteria exposed to toxic environmental pollutants.

## Tänu sõnad

Täna oma juhendajaid Tanel Ilmjärve ning Maia Kivisaart kannatlikkuse ning toetuse eest.

Ühtlasi teen suure kummarduse kõigi laborikaaslaste ning õppejõudude ees, kes nõu ja jõuga kõikidele mu küsimustele vastuseid on aidanud leida.

Samuti olen tänulik oma perekonnale ja sõpradele, kelle lõputu innustamine ning inspiratsioon tuult tiibades on hoidnud.

## Kasutatud kirjandus

- Adams, M. H. (1959). "Bacteriophages." Interscience Publishers Inc. N. Y: 445-447.
- Åslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol – disulphide status. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6161-6165.
- Bååth, E., Frostegård, Å., Fritze, H. (1992). Soil Bacterial Biomass, Activity, Phospholipid Fatty Acid Pattern, and pH Tolerance in an Area Polluted with Alkaline Dust Deposition. *Applied and Environmental Microbiology.* 58, 12, 4026-4031.
- Bauchop, T. and S. R. Elsdon (1960). "The growth of micro-organisms in relation to their energy supply." *J Gen Microbiol* 23: 457-469.
- Bergogne-Berenzin, E. & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 9, 148–165.
- Bijlsma, R., Loescheke, V. (2005). Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Journal of Evolutionary Biology.* 18, 4, 744-749.
- Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H., Mawhinney, D. B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci Total Environ.* 366:772-83.
- Carmona, M., Zamarro, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodriguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J. A., Barragán, M. J. L., García, J. L., Díaz, E. (2009). Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 73, 1, 71-133.
- Cases, I., de Lorenzo, V. (2005). Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nature Reviews Microbiology.* 3, 105-118.
- Cassidy, D. P., Hudak, A. J. (2001). Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. *Journal of Hazardous Materials.* B84, 253-264.
- Chen, Wei-Hsiang, Yang, Wen-Ben, Yuan, Chung-Shin, Yang, Jun-Chen, Zhao, Qing-Liang. (2013). Influences of Aeration and Biological Treatment on the Fates of of Aromatic VOCs in Wastewater Treatment Processes. *Aerosol and Air Quality Research.* 13:225-236.
- Chung, T.-P., Tseng, H.-Y., Juang, R.-S. (2003). Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process Biochemistry.* 38, 1497-1507.
- Compeau, G., Al-Achi, B. J., Platsouka, E., Levy, S. B. (1988). Survival of Rifampin-Resistant Mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in Soil Systems. *Applied and Environmental Microbiology.* 54, 10, 2432-2438.
- Costerton, J.W. (1999) Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11:217-22; discussion 237-219.

- Domínguez-Cuevas, P., González-Pastor, J. E., Marqués, s., Ramos, J. L., de Lorenzo, V. (2006). Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J Biol Chem* 281: 11981-11991.
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7160-7164.
- Dutton, P. L., Evans, W. C. (1969). The Metabolism of Aromatic Compounds by *Rhodopseudomonas palustris*. *Biochem. J.* 113, 525-535.
- Easter, C., Quigley, C., Burrowes, P., Witherspoon, J., Apgar, D. (2005). Odor and air emissions control using biotechnology for both collection and wastewater treatment systems. *Chemical Engineering Journal.* 113, 93-104.
- Fletcher, A. (1977) The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachments to polystyrene. *Can. J. Microbiol.* 23: 1-6.
- Foster, P. L., (2007) Stress-Induced Mutagenesis on Bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42(5): 373-397.
- Friedberg, E. C., Wagner, R., Radman, M. (2002). Specialized DNA polymerases, cellular survival and the genesis of mutations. *Science.* 296, 1627-1630.
- Galhardo, R., Hastings, P., Rosenberg, S. M. (2007). Mutation as a Stress Response and the Regulation of Evolvability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 42(5): 399-435.
- Gargouri, B., Karray, F., Mhiri, N., Aloui, F., Sayadi, S. (2011). Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. *Journal of Hazardous Materials.* 189, 428-434.
- Giraud, A., Radman, M., Matic, I., Taddei, F. (2001). The rise and fall of mutator bacteria. *Current Opinion in Microbiology.* 4:582-585.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2005) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* 7: 894-906.
- Gomes, H. I., Dias-Ferreira, C., Riberio, A. B. (2013). Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. *Science of the Total Environment.* 445-446, 237-260.
- Gourse, R. L., Keck J. L. (2007). Magic spots cast spell on DNA primase. *Cell.* 128:823-824.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 35(5):1147-50.
- Harrison-Balestra, C., Cazzaniga, A. L., Davis, S. C., Merts, P. M. (2003). A Wound-Isolated *Pseudomonas aeruginosa* Grows a Biofilm In Vitro Within 10 Hours and Is Visualized by Light Microscopy. *Dermatol Surg.* 29:631-635.



- Hassen, A., Mahrouk, M., Ouzari, H., Cherif, M., Boudabous, A., Damelincourt, J. J. (2000). UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. *Bioresource Technology*. 74, 141-150.
- Hecker, M., Völker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 44, 35-91.
- Holder-Franklin, M. A. (1992). Aquatic microorganisms: processes, population, and molecular solutions to environmental problems. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*. 1:253-262.
- Hottes, A., Freddolino, P. L., Khare, A., Donnell, Z. N., Liu, J. C., Tavazoie, S. (2013). Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genet*. 9, 7.
- Humphries, K. M., Szveda, L. I. (1998). Selective Inactivation of  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase: Reaction of Lipoic Acid with 4-Hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*. 37, 15835-15841.
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lesson from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*. 11(7): 443-454.
- Jakovleva, J., Teppo, A., Velts, A., Saumaa, A., Moor, H., Kivisaar, M., Teras, R. (2012). Fis regulates the competitiveness of *Pseudomonas putida* on barley roots by inducing biofilm formation. *Microbiology*. 158, 708-720.
- Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L., Díaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT 2440. *Environmental Microbiology*. 4(12), 824-841.
- Jørgensen, K. S., Puustinen, J., Suortti, A.-M. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*. 107, 245-254.
- Kim, J., Park, W. (2014). Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6933-6946.
- Kivisaar, M. (2010). Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads. *FEMS Microbiol Lett*. 312(1):1-14.
- Kivisaar, M., Tegova, R., Tover, A., Jatsenko, T. (2009). Molecular characterization of Rif<sup>r</sup> mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 683, 106-114.
- Kivistik, P.A., Putrinš, M., Püvi, K., Ilves, H., Kivisaar, M., and R. Hõrak. 2006. ColRS two-component system regulates membrane functions and protects *Pseudomonas putida* against phenol. *J. Bacteriol*. 188:8109-8117.
- Kshirsagar, A. D. (2013). Bioremediation of wastewater by using microalgae: an experimental study. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2, 3, 2250-3137.

- Kuban, W., Banach-Orlowska, M., Schaaper, R. M., Jonczyk, P., Fijalkowska, I. J. (2006). Role of DNA Polymerase IV in *Escherichia coli* SOS Mutator Activity. *Journal of Bacteriology*. 188, 22, 7977-7980.
- Kuo, C. F., Mashino, T., Fridovich, I. (1987).  $\alpha$ ,  $\beta$ -Dihydroxyisovalerate dehydratase: a superoxide-sensitive enzyme. *J Biol Chem* 262:4724-4727.
- Kurg, C. E., Frink, C. R. (1983). Acid Rain on Acid Soil: A New Perspective. *Science*. 221, 520-525.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – a review – part II. *Chemosphere*. 75:435-41.
- Layton, J. C., Foster, P. L. (2003). Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*. 50, 2, 549-561.
- Lee, K. (1999). Benzene-Induced Uncoupling of Naphtalene Dioxygenase Activity and Enzyme Inactivation by Production of Hydrogen Peroxide. *J. Bacteriol.* 181, 9, 2719-2725.
- Lenski, R. E., Barrick, J. E. (2013). Genome dynamics during experimental evolution. *Nat Rev Genet.* 14(12): 827-839.
- Lenski, R. E., Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J. (1997). Evolution of high mutatsioon rates in experimental populations of *E.Coli*. *Nature*. 383, 703-705.
- Leung, M., (2004). Bioremediation Techniques for Cleaning up a mess. *BioTeach Journal*. 2, 18-22.
- Ling, H., Boudsocq, F., Woodgate, R., Yang, W. (2001). Crystal Structure of a Y-Family DNA Polymerase in Action: A Mechanism for Error-Prone and Lesion.Bypass Replication. *Cell*. 107, 1, 91-102.
- Liu, K., Han, W., Pan, Wei-Ping, Riley, J. T. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a coal-fired pilot FBC system. *Journal of Hazardous Materials*. 175-188.
- Lomovskaya, O., Lee, A., Hoshino, K., Ishida, H., Mistry, A., Warren, M. S., Boyer, E., Chamberland, S., Lee, V. J. (1999). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43, 6, 1340-1346.
- Manzano, M. A., Perales, J. A., Sales, D., Quiroga, J. M. (1999). The Effect of Temperature on the biodegradation od a nonylphenol poluethoxylate in river water. 33, 11, 1593-2600.
- Marrot, B., Barrios-Martinez, A., Moulin, P., Roche, N. (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 30, 174-183.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in Molecular Genetics." Cold Spring Harbour Press N.Y.
- Mongkolsuk, S., Dubbs, D. J. (2012). Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *J Bacteriol.* 194:5495-5503.

- Nikolaou, A. D., Golfinopoulos, S. K., Kostopoulou, M. N., Kolokythas, Lekkas, T. D. (2002). Determination of volatile organic compounds in surface waters and treated wastewater in Greece. *Water Research*. 36:2883-2890.
- Nõlvak, H., Truu, J., Kriipsalu, M., Kurnasov, A. (2007). Seiratava loodusliku tervenemise kasutamine saneerimismeetodina. *Keskkonnatehnika*. 7:17-19.
- Nyström, T. (2004). Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol* 58:161-81.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295-304.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, R., Baquero, F., Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1253.
- Pandza, S., Baetens, M., Park, C. H., Au, T., Keyhan, M., Martin, A. (2000). The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Molecular Microbiology*. 36, 2, 414-423.
- Picado, A., Nogueira, A., Baeta-Hall, Lina., Medonca, E., Rodrigues, M. F., Sääagua, M. C., Martins, A., Anselmo, A. M. (2006). Landfarming in a PAH-contaminated soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 39, 9, 1579-1588.
- Pieper, D. H., Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 11:262-270.
- Piper, D. H., Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 11:262-270.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A., Terán, W., and Segura, A. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56:743-768.
- Reasoner, D. J., Geldreich, E. E. (1985). A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 49, 1, 1-7.
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D. U., Strömpl, C., Moore, E. R. B., Timmis, K. N. (2002). Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environmental Microbiology*. 4, 12, 912-915.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*. 447, 345-360.
- Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* 34(5): 658-84.
- Ryall, A., Eydallin, G., Ferenci, T. (2012). Culture History and Population Heterogeneity as Determinants of Bacterial Adaptation: the Adaptomics of a Single Environmental Transition. *Microbiol Mol Biol Rev* 76(3): 597-625.

- Sá, C. S. A., Boaventura, R. A. R. (2001). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas Putida* DMS 548 in a trickling bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*. 9, 3, 211-219.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kacmaz, K., Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73:39 – 85.
- Santos, P.M., Benndorf, D., and Sá-Correia, I. (2004) Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics* 4:2640-2652.
- Seklemova, E., Pavlova, A., Kovacheva, K. (2001). Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*. 12:311-316.
- Seo, Jong-Su, Keum, Young-Soo, Li, Q. X., (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6, 278-309.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35(4): 625-80.
- Singh, R., Paul, D., Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*. 19, 4, 299-397.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J., Lenski, R. E. (1997). Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E.coli*. *Nature*. 387, 703-705.
- Sze, C. C., Moore, T., Shingler, A. (1996). Growth Phase-Dependent Transcription of the  $\sigma^{54}$ -Dependent *Po* Promoter Controlling the *Pseudomonas*-Derived (Methyl)phenol *dmp* Operon of pVI150. *Journal of Bacteriology*. 178, 13, 3727-3735.
- Staudenbauer, W. L. (1976). Replication of small plasmids in extracts of *Escherichia coli*: Requirement for both DNA polymerases I and III. *Molecular and General Genetics* MGG. 149,2, 151-158.
- Sundin, G. W., Weigand, M. R. (2007). The microbiology of mutability. *Microbiol Lett.* 277, 1, 11-20.
- Sutton, M. D., Smith, B. T., Godoy, V. G., Walker, G. C. (2000). The SOS Response: Recent Insights into *umuDC*-Dependent Mutagenesis and DNA Damage Tolerance. *Annu. Rev. Genet.* 34:497-97.
- Žgajnar, A., Zagorc-Končan, J. (1999). Biodegradation studies as an important way to estimate the environmental fate of chemicals. *Wat. Sci Tech.* 39, 10-11, 375-382.
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., de Carvalho, C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. 22, 2, 231-241.
- Tark, M., Tover, A., Tarassova, K., Tegova, R., Kivi, G., Hörak, R., Kivisaar, M. (2005). A DNA Polymerase V Homologue Encoded by TOL Plasmid pWW0 Confers Evolutionary

Fitness on *Pseudomonas putida* Under Conditions of Environmental Stress. Journal of Bacteriology. 187, 15, 5203-5213.

Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., Molin, S. (2000). Development and Dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. Journal of Bacteriology. 182, 22, 6482-6489.

Viggor, S., Heinaru, E., Künnapas, A., Heinaru, A. (2008). Evaluation of different phenol hydroxylase-possessing phenol-degrading pseudomonas by kinetic parameters. Biodegradation. 19:759-769.

Vogel, T. M. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. Current Opinion in Biotechnology. 7:311-316.

Watanabe, K., Hamamura, N., (2003). Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. Current Opinion in Biotechnology. 14:289-295.

Watson, J. G., Chow, J. C., Fujita, E. M. (2001). Review of volatile organic compounds source apportionment by chemical mass balance. Atmospheric Environment. 35:1568-1584.

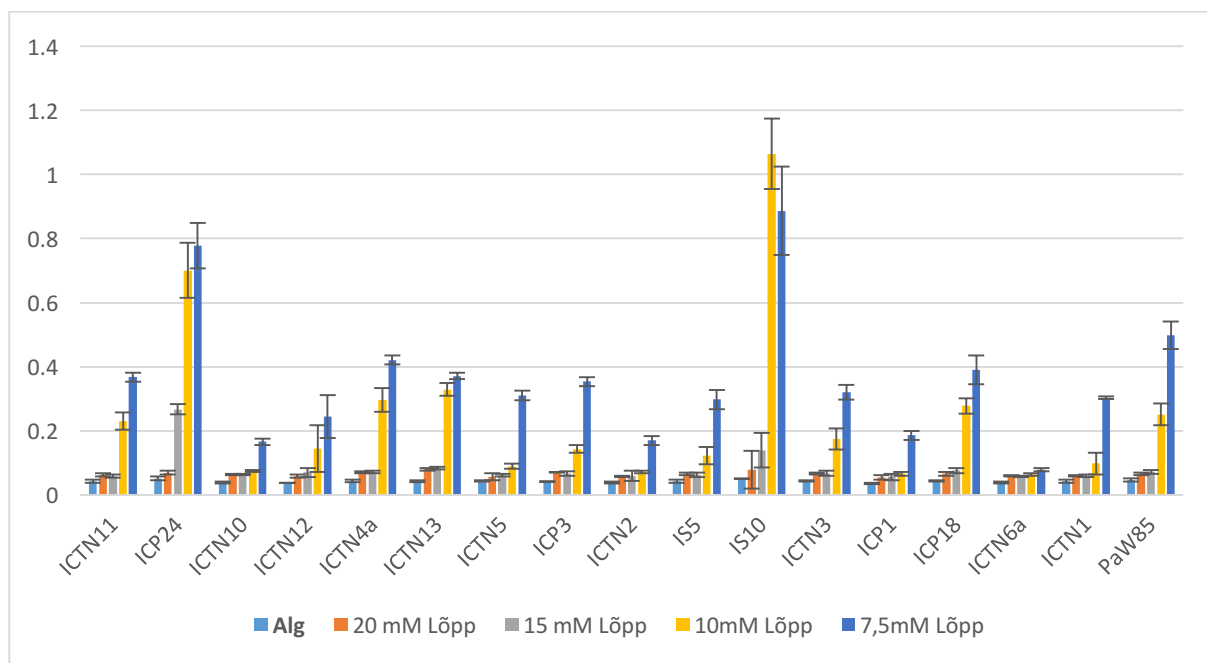
Yang, W. (2003). Damage repair DNA polymerases Y. Current Opinion in Structural Biology. 13:23-30.

## LISAD

**Lisa 1.** Erinevate bakteritüvede DNA kahjustuste talumisvõime protsentuaalsed väärtused

|        | UV-10 J/m <sup>2</sup> (%) | UV-20 J/m <sup>2</sup> (%) |
|--------|----------------------------|----------------------------|
| IS10   | 55,8                       | 29,2                       |
| ICTN5  | 6,4                        | 1,1                        |
| ICP3   | 72,7                       | 13,2                       |
| ICTN3  | 57,0                       | 33,3                       |
| ICTN10 | 15,1                       | 2,5                        |
| ICTN13 | 92,6                       | 19,0                       |
| IS5    | 15,2                       | 2,7                        |
| ICP1   | 41,6                       | 8,8                        |
| ICTN12 | 82,1                       | 42,0                       |
| ICTN1  | 35,5                       | 6,8                        |
| ICP24  | 85,2                       | 63,7                       |
| ICTN4a | 73,8                       | 27,9                       |
| ICP18  | 5,7                        | 0,9                        |
| ICTN2  | 77,2                       | 20,2                       |
| ICTN6a | 42,4                       | 23,8                       |
| PaW85  | 4,2                        | 0,1                        |

**Lisa 2.** Bakterikultuuride optilised tihedused MIC katse alguses (nullpunkt) ja katse lõpus (kultuurid kasvanud üleöö) erinevatel fenooli kontsentratsioonidel.



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Angela Peeb

(sünnikuupäev: 23.07.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

### **Naftatööstuse jääkprodukte lagundavate bakterite stressitaluvus**

mille juhendajad on Maia Kivisaar ja Tanel Ilmjärv

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.